

Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Optimierung von Kupplungsverfahren für die Peptidsegmentkondensation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie



eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

von Diplomchemikerin Christiane Hanay

geb. am 13. September 1967 in Mühlhausen/Thür.

Dekanin in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. V. Bonačić-Koutecký

Gutachter: 1. Prof. Dr. Hans-Werner Abraham

2. Prof. Dr. Michael Bienert

3. Prof. Dr. Jürgen Liebscher

eingereicht: 27. März 1998

Datum der Promotion: 29. Juli 1998

Abstrakt

Der Verlust der chiralen Integrität am aktivierten Carboxylrest im Verlauf der Peptidsegmentkondensation mit Uroniumsalzen wird durch die Bildung von Oxazolone in Gegenwart des zur Aktivierung der Carboxylgruppe notwendigen tertiärenamins verursacht. Während der Aktivierung geschützter Peptidsegmente in Gegenwart von 2 Äq. des tertiärenamins ändert sich die Lage des Aktivester/Oxazolone-Gleichgewichtes in Abhängigkeit von der Natur der Abgangsgruppe im Uroniumsalz mit steigendem Oxazolonegehalt in der Reihenfolge HONB << HOBt < HOAt. Bei Segmentkupplungen mittels Uroniumsalzen wurde ein Ausmaß der Stereomutation direkt entgegengesetzt zur Menge an Oxazolone gefunden. Für diese unerwartete Reihenfolge sind der sinkende Anteil an freier N-Hydroxyverbindung zur Neutralisation der benötigten Base und unterschiedliche Geschwindigkeiten der Bildung und Aminolyse des intermediären Aktivesters verantwortlich. Hinsichtlich der Verringerung der Stereomutation werden alternative Aktivierungsmethoden diskutiert, wie die Herstellung von Aktivestern über Mischanhydride durch Verwendung von Chlorameisensäurealkylestern und Zusatz von HONB oder die Verwendung des neuen Reagenzes Chlorocarbonyloxybenzotriazol. Eine neue effiziente Kupplungsmethode besteht in der Verwendung von Peptidsäurefluoriden, hergestellt durch Zusatz von Pyridin-poly(hydrogenfluorid) zum zuvor gebildeten Peptidoxazolone oder in dem Zusatz dieses HF-Additivs bei der Uroniumsalzkupplung zur Unterdrückung der basenkatalysierten Stereomutation. Außerdem wurde hier erstmalig die bisher als erster Schritt der Aktivierung mit Uroniumsalzen angenommene O-Acyluroniumverbindung am Modell der Aktivierung der sterisch gehinderten Mesitylencarbonsäure mit dem 7-Aza-benzotriazolyl-Reagenz HAPyU mittels ^{13}C -NMR-Tieftemperatur-Untersuchungen direkt nachgewiesen.

Abstract

Loss of chiral integrity at the activated carboxyl residue during peptide segment condensation by means of uronium salts is caused by the formation of oxazolone in the presence of the tertiary amine which is necessary for activation of carboxylic group. During activation of a protected peptide in the presence of 2 equivalents of tertiary amine the position of the active ester/oxazolone equilibrium is dependent on the nature of the leaving group of the uronium salt with an increasing oxazolone content in the order HONB << HOBt < HOAt. Segment coupling by means of uronium salts result in an extent of stereomutation which is directly opposite to the extent of oxazolone formation. This unexpected order is caused by the presence of decreasing amounts of the free N-hydroxy component neutralizing the base, and differing rates of formation and aminolysis of intermediate active esters. Alternative activation procedures are discussed with regard to reduction of stereomutation: the preparation of active esters through mixed anhydrides by use of alkyl chloroformates followed by addition of HONB or by use of the new reagent chlorocarbonyloxybenzotriazole. A new efficient coupling method resulted from the use of peptide acid fluorides prepared by addition of pyridin-poly(hydrogenfluoride) to pre-formed peptide oxazolone, or the addition of this HF-pyridine complex to couplings via uronium salts, suppressing the base-catalyzed stereomutation. For the first time, direct evidence of the O-acyluronium salt assumed to be the first step during activation via uronium salts was found by means of low temperature ^{13}C NMR measurements of the activation of the sterical hindered mesitoic acid with the 7-aza-oxybenzotriazolyl derivative HAPyU.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	8
1.1. Bedeutung und Stand der Entwicklung der Peptidsynthese	8
1.2. Prinzip der Peptidsynthese	8
1.2.1. Schrittweiser Aufbau der Peptidkette	9
1.2.2. Segmentkondensation	10
1.3. Problem und Mechanismen der Epimerisierung	11
1.4. Kondensationsreagenzien	13
1.5. Ziel der Arbeit	17
2. URONIUMSALZE FÜR DIE PEPTIDSEGMENTKONDENSATION	19
2.1. Epimerisierung bei Anwendung von bekannten Uroniumsalzen	19
2.2. Modifikation der Uroniumstruktur	20
3. UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER REAKTIONEN MIT URONIUMSALZEN	22
3.1. Nachweis und Reaktivität der O-Acyluroniumverbindung	23
3.1.1. Mesitylencarbonsäure-Aktivierung als Modell zum Nachweis der O-Acyluroniumverbindung	24
3.1.2. Reaktivität der Aktivderivate der Mesitylencarbonsäure	28
3.2. Bildung von Oxazolon und Aktivester im Verlauf der Aktivierung von Peptidsegmenten mit Uroniumsalzen	29
3.2.1. Aktivierung mit Uroniumsalzen im unpolaren Lösungsmittel	29
3.2.2. Aktivierung mit Uroniumsalzen im polaren Lösungsmittel	31
3.3. Einfluß des Aktivester/Oxazolon-Gleichgewichtes auf das Ausmaß der Stereomutation	38
3.3.1. Epimerisierung der Aktivester	38
3.3.2. Epimerisierung bei Anwendung der Uroniumsalze	40
3.3.3. Schlußfolgerungen	43
4. MISCHANHYDRIDSYNTHESE	44
4.1. Aktivierung mit Chlorameisensäureestern unter Zusatz von N-Hydroxyverbindungen	44

4.2.	Aktivierung mit Chlorameisensäureaktivestern	45
4.3.	Schlußfolgerung zur Anwendbarkeit der Mischanhydridsynthese zur Segmentkondensation	47
5.	PEPTIDSEGMENTKONDENSATION UNTER VERWENDUNG VON PYRIDIN-POLY(HYDROGENFLUORID)	48
5.1.	Modelluntersuchungen zur <i>in situ</i> Synthese und Kupplung von Peptidsegmentfluoriden	48
5.2.	Verringerung der Epimerisierung durch Zusatz des Pyridin- poly(hydrogenfluorid)- Additivs zur Kupplung mit Uroniumsalzen	53
5.3.	Nebenreaktionen bei Verwendung des Pyridin-poly(hydrogenfluorid)- Additivs	56
5.4.	Übertragung der HAPyU/ HF-Komplex-Kupplungsmethode auf die Segmentkondensation von ACP(65-74)	57
5.5.	Bedeutung der Kupplung in Gegenwart des Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplexes	60
6.	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	61
7.	EXPERIMENTELLER TEIL	64
7.1.	Chemikalien	64
7.2.	Analytische Methoden	64
7.3.	Synthese von Kondensationsreagenzien	66
	1-(1-Pyrrolidiny1-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylmethyl)pyrrolidinium- hexachloroantimonat-N-Oxid (Kapitel 3.1.1., Abb. 12, 19b)	68
7.4.	Synthese von Mesitylencarbonsäurederivaten	69
7.5.	Kinetische Untersuchungen an Mesitylencarbonsäurederivaten	71
7.6.	Kinetische Untersuchungen zur Aktivierung von Peptidsegmenten	72
7.7.	Modellpeptide für Epimerisierungsuntersuchungen	76
	H-Gly-L/DAla-Leu-OH (Referenz)	76
	H-Gly-L/DVal-Val-OBn	77
	Z-Gly-L/DAla-Leu-pNA (Referenz)	79
7.8.	Epimerisierungsuntersuchungen	79
7.9.	Segmentkondensation von ACP(65-74) mit HAPyU/ Pyridin-poly (hydrogenfluorid)-Komplex (Kapitel 5.4.)	82

8. LITERATURVERZEICHNIS	86
9. ANHANG	I
Spektroskopische Daten	I
Eidesstattliche Erklärung	IX
Danksagung	X
Lebenslauf	XVI

Verwendete Abkürzungen

Sofern nicht anders angegeben, bezeichnen die Symbole der chiralen Aminosäuren das L-Isomer. Abkürzungen wurden entsprechend den Empfehlungen der IUPAC-IUB Kommission der Biochemischen Nomenklatur [1] verwendet. Zusätzlich wurden folgende Abkürzungen genutzt:

ACP	-	Acyl Carrier Protein
APT	-	Attached Proton Test
Äq.	-	Äquivalent
B	-	Base
Bn	-	Benzyl
BOC	-	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
BOP	-	(1H-Benzotriazol-1-yloxy)-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat
BSA	-	N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
t-Bu	-	<i>tert.</i> -Butyl
ClCOOBt	-	Chlorocarbonyloxybenzotriazol
ClCOOiBu	-	Chlorameisensäureisobutylester
ClCOONB	-	N-(Chlorocarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dicarboximid
Cq	-	Cquartär und Caromatisch, auch quartär
DAST	-	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DC	-	Dünnschichtchromatographie
DCC	-	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCU	-	N,N'-Dicyclohexylharnstoff
DCI	-	deuterierte Chlorwasserstoffsäure
DCM	-	Dichlormethan
DIC	-	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	-	Diisopropylethylamin
DMA	-	Dimethylacetamid
DMF	-	Dimethylformamid
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
EDC	-	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid · HCl
ES-MS	-	Elektrospray-Massenspektrometrie
Fmoc	-	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GC-MS	-	Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung

HAPyU	-	1-(1-Pyrrolidiny1-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylmethyl)pyrrolidiniumhexafluorophosphat-N-Oxid
HATU	-	N-[(Dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylmethyl]-N-methylmethanaminiumhexafluorophosphat N-Oxid
HBPYU	-	1-[1-Pyrrolidiny1-(1H-benzotriazol-1-yl)methyl]-pyrrolidiniumhexafluorophosphat-N-Oxid
HBTU	-	N-[(1H-benzotriazol-1-yl)-(dimethylamino)methyl]-N-methylmethanaminiumhexafluorophosphat-N-Oxid
HFIP	-	Hexafluorisopropanol
HF-Pyr	-	Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplex
HOAt	-	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	-	1-Hydroxybenzotriazol
HONB	-	N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid
HONSu	-	N-Hydroxysuccinimid
IR	-	Infrarot-Spektroskopie
LH-RH	-	Luteinisierungshormon-Releasing-Hormon
LLL/LLD	-	Obwohl strenggenommen bei den gewählten Modellpeptiden nur zwischen LL- und DL-Isomer unterschieden werden kann, wurde aufgrund der Allgemeingültigkeit generell die Bezeichnung LLL- und LDL-Isomer verwendet.
Me	-	Methyl
MesitOH	-	Mesitylencarbonsäure
Mesit-OAt-Ester	-	Mesitylencarbonsäure-OAt-Ester
Mesit(Py) ₂ ⁺ SbCl ₆ ⁻	-	Bipyrrolidino[(mesitylcarbonyl)oxy]uroniumhexachloroantimonat
Mesit(Py) ₂ ⁺ PF ₆ ⁻	-	Bipyrrolidino[(mesitylcarbonyl)oxy]uroniumhexafluorophosphat
NMM	-	N-Methylmorpholin
NMP	-	N-Methylpyrrolidinon
NMR	-	Kernresonanzspektroskopie
OAt	-	7-Aza-oxybenzotriazolyl
OBt, Bt	-	Oxybenzotriazolyl
ONB, NB	-	5-Norbornen-2,3-dicarboximidyl
ONSu, NSu	-	Succinimido
OPy	-	2-Oxo-1(2H)-pyridyl
(Pip) ₂ C ⁺ -Cl	-	Bipiperidinochloroformamidiniumhexafluorophosphat

pNA	-	p-Nitroanilid
PyBOP	-	(1H-Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
PyCloP	-	Chlorotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
(Pyr) ₂ C ⁺ -Cl	-	Bipyrrolidinochloroformamidiniumhexafluorophosphat
RP-HPLC	-	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
RT	-	Raumtemperatur
SPPS	-	Solid-Phase Peptide Synthesis
TBPipU	-	1H-Benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-bis(pentamethylen)uronium tetrafluoroborat
TBPyU	-	1H-Benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-bis(tetramethylen)uronium tetrafluoroborat
TBTU	-	1H-Benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TCM	-	Trichlormethan
TEA	-	Triethylamin
TFA	-	Trifluoressigsäure
TFE	-	Trifluorethanol
THF	-	Tetrahydrofuran
TNTU	-	2-(5-Norbornen-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat
TOCSY	-	Total Correlation Spektroskopie
TOPPipU	-	2-[2-Oxo-1(2H)-pyridyl]-1,1,3,3-bis(pentamethylen)-uronium tetrafluoroborat
Tos	-	p-Toluensulfonyl
t _R	-	Retentionszeit
Trt	-	Trityl (Triphenylmethyl)
Z	-	Benzyloxycarbonyl

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Bedeutung und Stand der Entwicklung der Peptidsynthese

Polypeptide spielen strukturell und funktionell eine Schlüsselrolle in der Biochemie, Pharmakologie und Neurobiologie. Für ihre Bereitstellung ergibt sich die Notwendigkeit der Entwicklung von schnellen, effizienten und zuverlässigen Methoden zur chemischen Synthese. Damit können die Strukturen von neu isolierten Wirkstoffen mit Peptidstruktur, wie Hormone, Neuropeptide, Antibiotika u.a., bestätigt und diese in größerem Maßstab für weitere Untersuchungen bereitgestellt werden. Die daraus folgende größere Verfügbarkeit synthetischer Analoga verschiedener Sequenzen ist Voraussetzung für Struktur-Aktivitäts-Studien an Peptidwirkstoffen. Die nach verschiedenen Prinzipien durchgeführten Modifikationen der Struktur von Peptidwirkstoffen dienen u.a. der Verlängerung bzw. Verstärkung der biologischen Wirkung (z.B. Stabilisierung gegen enzymatischen Abbau, Kettenverkürzung ohne Wirkungsverlust im Hinblick auf ökonomische Aspekte) [2].

Die meisten Polypeptide sind heute mit Hilfe der Festphasensynthese unter Verwendung des Urethanschutzes routinemäßig synthetisierbar. Die chemische Synthese von Proteinen dagegen ist, bis auf wenige Ausnahmen, noch stark limitiert. Entsprechend dem gegenwärtigen Entwicklungsstand kann das Problem der chemischen Proteinsynthese aufgrund der Akkumulation von Nebenprodukten bei Anwendung der Festphasensynthesetechnik nicht gelöst werden. Eine Möglichkeit, diese Schwierigkeiten zu umgehen, bietet die Kondensation von Peptidsegmenten. Voraussetzung dafür ist jedoch die Verfügbarkeit effektiver Segmentkondensationsmethoden. Zwar wurden dafür gute Kupplungsmethoden in unpolaren Lösungsmitteln beschrieben, jedoch besitzen geschützte Peptidsegmente hierin nur eine geringe Löslichkeit. Aufgrund dessen ist der Übergang zu polaren Lösungsmitteln erforderlich, wofür jedoch bisher keine geeigneten epimerisierungsarmen Kupplungsmethoden existieren.

1.2. Prinzip der Peptidsynthese

Die Bildung einer Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren erfolgt in der Regel durch die Aktivierung der Carboxylkomponente und dem nachfolgenden nukleophilen Angriff der Aminokomponente. Dazu muß das elektrophile Potential der Carboxylfunktion durch Einführung elektronenziehender Substituenten (-I, -M) erhöht werden. Die prinzipiell ebenso mögliche Aktivierung der Aminokomponente findet geringe praktische Anwendung,

da mit der Einführung von elektronenschiebenden Substituenten, die die Nukleophilie des Amino-Stickstoffs erhöhen (z.B. tert.-Butylgruppe) gleichzeitig die Acylierungsgeschwindigkeit infolge erhöhter sterischer Hinderung gesenkt wird.

Für einen eindeutigen Verlauf der Peptidsynthese ist es notwendig, alle funktionellen Gruppen, die nicht am Peptidknüpfungsschritt beteiligt werden sollen, temporär zu blockieren. Weiterhin benötigen Aminosäuren, die nicht teilnehmende, reaktive Drittfunktionen besitzen, zwangsläufig einen selektiven, reversiblen Schutz. Die Peptidsynthese ist demnach ein Mehrstufenprozeß, der die Darstellung partiell geschützter Aminosäuren, die Aktivierung und Kupplung sowie die selektive Deblockierung beinhaltet. Da die Teilschritte des Peptidaufbaus von unerwünschten Nebenreaktionen begleitet sein können, ist im allgemeinen eine Reinigung der Zwischen- und Endprodukte erforderlich. Obwohl die biosynthetische Peptidsynthese vom N- zum C-Terminus erfolgt und diese Strategie lediglich den Schutz einer α -Aminogruppe erfordert, wird die chemische Kettenverlängerung in der Regel vom C- zum N-Terminus durchgeführt. Hauptgrund dafür ist die Gefahr der Stereomutation während der Kupplung von N in C-Richtung [3].

Zwei grundsätzliche Methoden werden für die Synthese von Peptiden angewendet: die schrittweise Kettenverlängerung, die die Aktivierung von urethangeschützten Aminosäuren beinhaltet und die Segmentkondensation, bei der als aktivierte Komponenten geschützte Peptidsequenzen eingesetzt werden.

1.2.1. Schrittweiser Aufbau der Peptidkette

Konventionelle Verfahren zum schrittweisen Kettenaufbau der Zielsequenz werden in Lösung unter Reinigung und Charakterisierung der vollgeschützten Zwischenprodukte auf jeder Stufe durchgeführt. Aufgrund der abnehmenden Löslichkeit der wachsenden Peptidkette ist diese Methode im allgemeinen auf die Synthese kürzerer Peptide beschränkt. Methoden zum schrittweisen Aufbau eines Peptides in Lösung ohne Isolierung von Zwischenprodukten, bei denen Reaktionsnebenprodukte und Reagenzienüberschüsse durch Extraktion, Zentrifugation, Fällung und Filtration entfernt werden, sind in verschiedenen Arbeitskreisen entwickelt worden (Repetitive Excess Mixed Anhydride Method [4], N-Carbonsäureanhydrid/N-Thiocarbonsäureanhydrid-Methode [5], Pentafluorphenylester-Methode [6], Fmoc-Amino-Acid-Chloride-Solution-Technique [7], Fmoc-Amino-Acid-Fluoride-Solution-Technique [8]).

Das Prinzip der 1962 von MERRIFIELD [9] eingeführten Festphasensynthese (SPPS) besteht in der kovalenten Verknüpfung der wachsenden Peptidkette an einen unlöslichen polymeren Träger und dem schrittweisen Aufbau des Peptides vom C- zum N-Terminus mittels aufeinanderfolgender Kupplungs- und Abspaltzyklen. Der entscheidende Vorteil liegt darin, daß Überschüsse an Reagenzien und Nebenprodukte durch einfache Wasch- und Filterprozesse vom polymergebundenen Peptid abgetrennt werden können, womit eine Automatisierung der Synthese vereinfacht wird. Nach Abschluß der Synthese wird das Peptid vom Träger abgespalten, gereinigt und charakterisiert. Voraussetzung für die Herstellung einheitlicher Produkte ist, daß jede Teilreaktion eindeutig und quantitativ verläuft. Durch auftretende Nebenreaktionen, z.B. Abspaltung der Schutzgruppen trifunktioneller Aminosäuren und Weiterreaktion der Drittfunktion, Stereomutation, Umlagerungen und Ringschlüsse kann es zur Verringerung der Ausbeute kommen. Die Bildung von Rumpf- und Fehlsequenzen bei unvollständigen Umsätzen, die dem gewünschten Produkt nahe verwandt sind und sich deshalb schwierig abtrennen lassen sowie der vorzeitige Kettenabbruch durch konformationsabhängige Effekte, wie die Ausbildung von β -Faltblattstrukturen, sind Probleme, die bislang nicht vollständig überwunden werden konnten [2].

Alternativ zur Synthese an der festen Phase wurden lösliche polymere Träger vorgeschlagen, wobei im Verlauf der Synthese die Abtrennung niedermolekularer Reagenzien durch Ultrafiltration bzw. durch Kristallisation des gewünschten Peptidpolymers erreicht wird. Obwohl der als Flüssigphasenmethode [10] bezeichnete Syntheseweg eine bessere analytische Kontrolle erlaubt, wirken sich die schlechtere Automatisierbarkeit, der Zeitaufwand und die verringerte Löslichkeit des Polymers mit wachsender Peptidkette als nachteilig aus [2].

1.2.2. Segmentkondensation

Aufgrund der mitunter großen Schwierigkeiten, homogene Produkte bei der schrittweisen Peptidsynthese zu erhalten und der Tatsache, daß sich eng verwandte Nebenprodukte bei zunehmender Kettenlänge des Peptides nur schwer vom Zielprodukt trennen lassen, ist für die effiziente Synthese langkettiger Peptide die Segmentkondensation von Vorteil. Dabei werden zunächst unabhängig voneinander geschützte Peptidsegmente mittlerer Länge synthetisiert, gereinigt und anschließend zum Zielpeptid verknüpft. Hierbei auftretende

Verunreinigungen unterscheiden sich vom Zielmolekül durch mindestens eine Segmenteinheit und lassen sich somit einfacher entfernen. Generell läßt sich die Kupplung der Segmente konventionell in Lösung oder an der festen Phase durchführen. Dabei können auch die Segmente sowohl in Lösung als auch an der festen Phase synthetisiert werden. Bei der konvergenten Festphasensynthese werden die geschützten Peptidsegmente mittels Festphasensynthese hergestellt, gereinigt und am festen Träger zur Zielsequenz vereinigt [11-13].

Ausbeute, Reinheit der Zielsequenz und Epimerisierungsgrad im Verlauf der Segmentkondensation werden durch verschiedene Parameter beeinflusst: z.B. die geeignete Einteilung des Zielpeptides in Segmente, die Art des Lösungsmittels, die Kupplungsmethode, die Reaktionszeit und gegebenenfalls die Wahl des polymeren Trägers [12,14].

Das Problem der häufig geringen Löslichkeit von geschützten Peptidsegmenten, abhängig von Kettenlänge, Aminosäuresequenz und Wahl der Seitenkettenschutzgruppen, ist hauptsächlich auf die Aggregation der Peptidketten (im Bereich von 4-18 Aminosäureresten) zu β -Faltblattstrukturen infolge inter- und intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen [15,16]. Um die Peptide in Lösung zu bringen, ist die Brechung der β -Faltblattstrukturen notwendig. Dies kann durch den Wechsel des Lösungsmittels zwischen DCM, DMF, DMA, NMP und DMSO oder den Einsatz gemischter Lösungsmittelsysteme, wie NMP/DMSO, THF/TCM, THF/DCM, HFIP/TCM oder HFIP/DCM, erreicht werden [17]. Auch Zusätze von chaotropen Salzen (z.B. LiCl, LiBr, KSCN, NaClO₄) sowie von Ethylencarbonat oder Harnstoffen zu aprotischen Lösungsmitteln werden eingesetzt, um die Löslichkeit der Segmente durch Zerstören der Wasserstoffbrückenbindungen zu erhöhen [18,19].

Für eine Segmentkondensation in unpolaren Lösungsmitteln ist die Carbodiimid/Additiv-Kupplung eine geeignete Methode. Die Löslichkeit geschützter Peptidsegmente in unpolaren Lösungsmitteln sinkt jedoch mit steigender Anzahl der Peptidbindungen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit des Übergangs zu polarerer Lösungsmitteln. Hier ist aber die Durchführung der Segmentkondensation, insbesondere die Aktivierung, problematisch. Bei Verwendung von Uroniumsalzen zur Segmentkondensation in polaren Lösungsmitteln kann eine schnelle Aktivierung zwar erreicht werden, jedoch wurde dabei Stereomutation beobachtet [20-22].

1.3. Problem und Mechanismen der Epimerisierung

Da Peptide Substanzen mit chiralen Zentren sind, ist die Konfiguration der zur Synthese eingesetzten Verbindungen von großer Bedeutung. Insbesondere sind die C-terminalen Aminosäuren geschützter Peptidsegmente im Verlauf der Aktivierungs- und Kupplungsschritte vom Verlust der chiralen Integrität betroffen, der als überwiegend basenkatalysierte Nebenreaktion auftritt. Dabei werden zwei unterschiedliche Wege der Epimerisierung diskutiert.

Bei der „direkten Protonenabstraktion“ bzw. „direkten Enolisierung“ führt die erhöhte CH-Azidität in Abhängigkeit des elektronenziehenden Effektes der aktivierenden Gruppe X, der β -Substituenten R, der katalysierenden Base und des Lösungsmittels zur Deprotonierung des α -Kohlenstoffatoms. Das sich häufig durch Mesomerie stabilisierende resultierende Carbanion kann nun auch unter Änderung der Konfiguration reprotoniert werden [23-26] (Abb. 1).

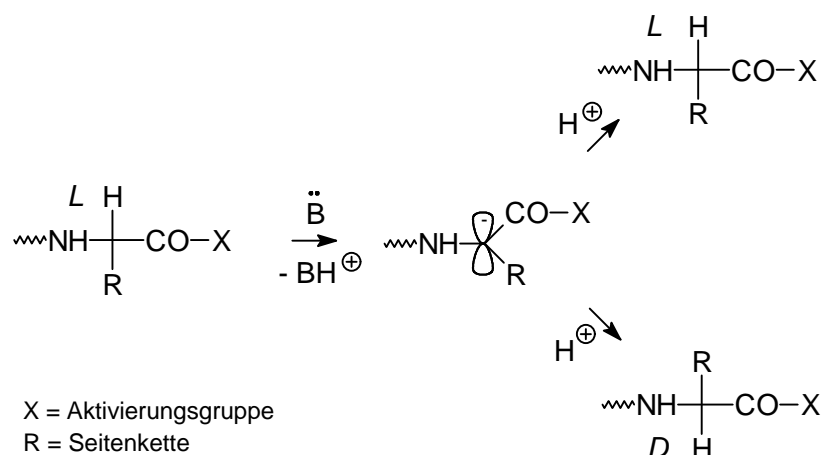


Abb. 1: Epimerisierung durch direkte Protonenabstraktion (nach [23])

Eine weitere Möglichkeit der Stereomutation besteht in der Deprotonierung während der Aktivierung gebildeter 5(4H)-Oxazolone (formal 2-Oxazolin-5-one, „optisch labile“ Azlactone, Abb. 2, **2**). Dabei wird durch stark elektronenziehende Substituenten X das C-Atom der Carboxyfunktion positiviert, wodurch der intramolekulare nukleophile Angriff des Carbonyl-Sauerstoff-Atoms begünstigt wird. Ist der Amino-Stickstoff des aktivierten Restes durch N-Acylgruppen oder mit einer Peptidkette acyliert, wird die Zyklisierung zum Oxazolon erleichtert (Abb. 2, **1a**). Außerdem hängt die Oxazolonbildung von der Basizität des Mediums, der Natur der zur Aktivierung eingesetzten Base, der Art des Lösungsmittels und von der Reaktionstemperatur ab. Die Abspaltung des Amidprotons durch eine Base

führt zum Amid-Anion (Abb. 2, **1b**), durch dessen nukleophilen Sauerstoff der Ringschluß zum Oxazolon erfolgt [24,27]. Dieses kann nach Wasserstoff-Abstraktion über eine anionische pseudoaromatische Zwischenstufe (Abb. 2, **2a**) (quasiionische Zwischenstufe [28]) in einem basenkatalysierten Gleichgewicht die beiden stereoisomeren Formen L (**2b**) und D (**2c**) bilden, die anschließend durch die Aminokomponente geöffnet werden können.

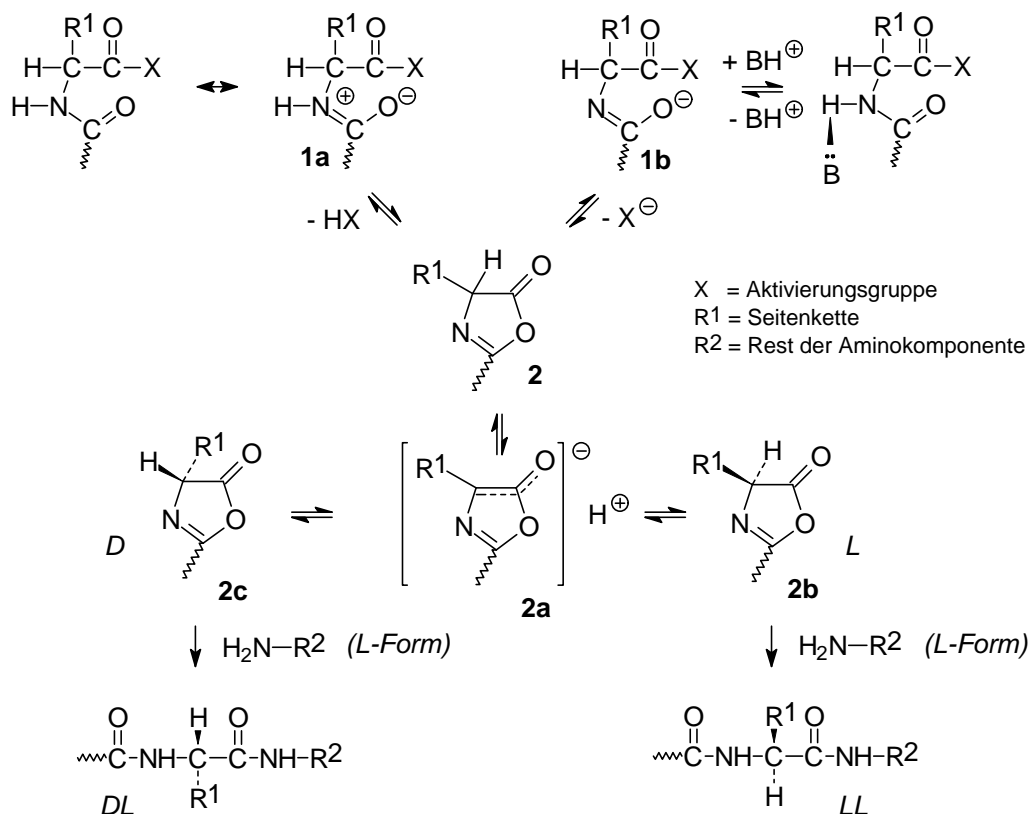


Abb. 2: Oxazolon-Mechanismus (nach [29])

Geschützte Peptidsegmente reagieren im Verlauf der Aktivierung unter Zyklisierung zu 5(4H)-Oxazolonen [30]. Die erhöhte baseninduzierte Labilität des 4-H Protons wird hierbei als Hauptursache der resultierenden Epimerisierung angesehen. Das steht im Gegensatz zur Aktivierung urethangeschützter Aminosäuren, bei der zwar auch Oxazolon gebildet wird, dieses aber wegen der erschwerten Protonenabstraktion eine höhere chirale Stabilität besitzt [31].

Neben der Epimerisierung durch Bildung von Oxazolon wurde von GRIEHL et al. [32] z.B. für eine Carbodiimid-vermittelte [2+1]-Segmentkondensation gefunden, daß auch die Bildung des LDL-Isomers (aus LL+L) direkt aus dem O-Acylisoharnstoff eine wesentliche Rolle spielt, die nach BODANSZKY [33] auf einen intramolekularen Protonenabstraktions-Mechanismus zurückzuführen ist.

1.4. Kondensationsreagenzien

Trotz vieler Untersuchungen konnte bisher keine allgemein anwendbare Technik für die Kupplung von Peptidsegmenten ohne Verlust der chiralen Integrität am aktivierten Carboxylrest entwickelt werden. Die zuerst von SHEEHAN und HESS [34] entwickelte Carbodiimid-Kupplung wird gegenwärtig bevorzugt unter Zusatz von Additiven zur Segmentkondensation angewendet. Diese Reaktionen verlaufen über die intermediäre Bildung des korrespondierenden Aktivesters. Der 1966 von WEYGAND [35] entdeckte epimerisierungssenkende Effekt von HONSu im Verlauf von DCC-Kupplungen stellte eine echte Alternative zur damals meist verwendeten Azidmethode [36] bei Segmentkondensationen dar. Jedoch besitzt diese Variante den Nachteil, daß es durch eine interne Konkurrenzreaktion zwischen DCC und HONSu zur Bildung eines unerwünschten Nebenproduktes Succinimido-oxycarbonyl- β -alanin-N-hydroxysuccinimidester kommt, was einen unkontrollierten β -Alanineinbau in die Peptidkette zur Folge hat [37,38]. Aus diesem Grund wird das dem HONSu strukturell verwandte, von FUJINO [39] vorgeschlagene HONB als Additiv bei DCC-Kupplungen bevorzugt, das die Bildung von Produkten in hoher Ausbeute mit geringer Epimerisierung erlaubt (siehe z.B. Synthese von LH-RH [29]). Im Vergleich zur Verwendung von HONSu oder HONB als Additiv bei Carbodiimid-Kupplungen ist das von KÖNIG und GEIGER [40,41] eingeführte HOBt hinsichtlich der Aminolysegeschwindigkeit des korrespondierenden Aktivesters, der Reaktionsausbeute sowie der Unterdrückung der Epimerisierung überlegen, wie an verschiedenen Modellen zur Segmentkondensation in Lösung und an der festen Phase gezeigt wurde [14,42-44]. In unpolaren Lösungsmitteln, wie z.B. Dichlormethan, verläuft die Kupplung via Carbodiimide in Gegenwart von Additiven, wie HOBt, ohne Stereomutation [21,40]. Jedoch erweist sich infolge der eingeschränkten Löslichkeit geschützter Peptide in unpolaren Lösungsmitteln (Kapitel 1.2.2.) der Übergang zu polareren Medien, wie z.B. DMF, als notwendig. Hier verläuft aber die Aktivierung via Carbodiimid langsam [45,46], und es kann zum Verlust der chiralen Integrität kommen [21,41]. Eine Verringerung der Epimerisierung von DCC/EDC-Kupplungen in DMF als Lösungsmittel kann z.B. durch den Einsatz von Lewis-Säuren erreicht werden, wobei sich CuCl_2 am besten bewährt hat [42,43]. Da in vielen Fällen durch den Zusatz von CuCl_2 im Vergleich zur Addition von HOBt eine entscheidende Verringerung der Epimerisierung (unter 0,1 %) zwar erzielt, aber gleichzeitig unbefriedigende Ausbeuten gefunden wurden, wurde von MIYAZAWA [47] eine simultane

Addition von HOBt und CuCl_2 vorgeschlagen. Im Ergebnis der Modellkupplung von Z-Gly-Val-OH an H-Val-OMe-TosOH in Gegenwart von TEA (zur Neutralisation) via EDC konnten die besten Bedingungen hinsichtlich Umsatz und Epimerisierung bei Einsatz eines Verhältnisses von 2 Äq. HOBt und 0,1 Äq. CuCl_2 erhalten werden, wobei HOBt als epimerisierungssenkendes Additiv durch die intermediäre Bildung des korrespondierenden OBt-Esters fungiert und CuCl_2 unterstützend die Basizität des Mediums herabsetzt [29]. Der epimerisierungssenkende Effekt einer simultanen Addition von HOBt und CuCl_2 konnte von HAVER und SMITH [48] auf eine Segmentkondensation am Harz via Phosphonium- und Uroniumsalze übertragen werden.

Mittlerweile haben sich alternativ zur Carbodiimid/Additiv-Kupplung, insbesondere für die SPPS urethangeschützter Aminosäuren, eine Vielzahl neu entwickelter Kupplungsreagenzien zur in situ Bildung von Aktivestern auf der Grundlage der Phosphonium- (z.B. BOP, Abb. 3, **4aku**) [49] und Uroniumstruktur (z.B. TBTU, Abb. 3, **3aiu**) [20,50] etabliert, die sich im Harnstoffteil (Tetramethyl (TBTU), Pyrrolidinyl (TBPYU, Abb. 3, **3aiiv**), Piperidinyl (TBPiU, Abb. 3, **3aiw**) [51]), in der Natur der Abgangsgruppe (OBt, OPy [51], OAt [52], ONSu [20], ONB [20]) und in der Art des Gegenions (BF_4^- , PF_6^-) unterscheiden und für deren Anwendung der Zusatz einer Base essentiell ist (Abb. 3) (Überblick siehe [53]).

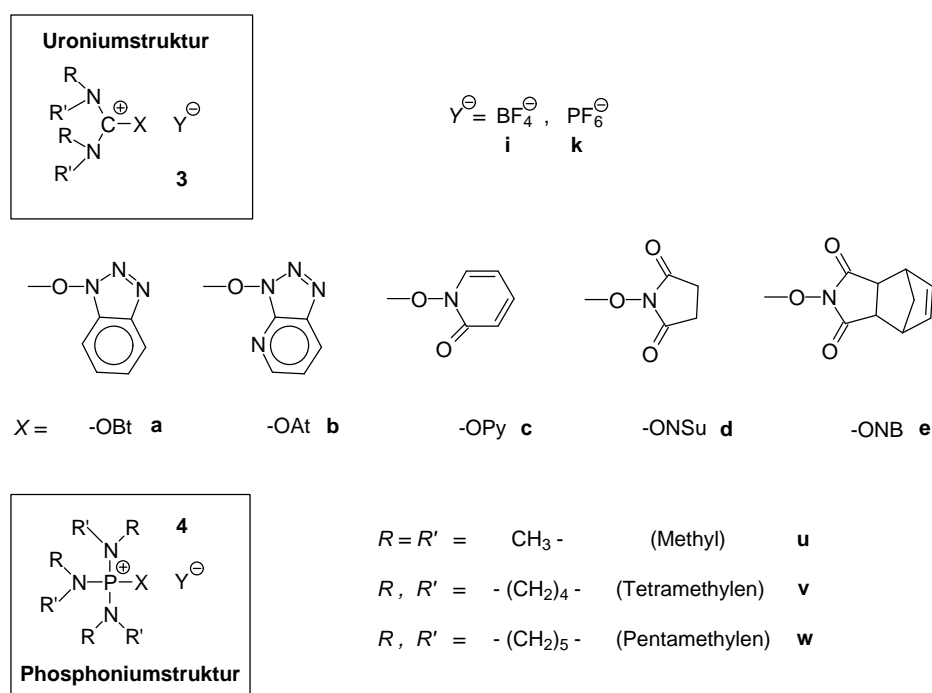


Abb. 3: Kondensationsreagenzien auf der Grundlage der Uronium (**3**)- und Phosphoniumstruktur (**4**)

Die Uroniumsalze HBTU (Abb. 3, **3aku**) und HATU (Abb. 3, **3bku**) kristallisieren im festen Zustand als Guanidinium-N-Oxid-Salze im Gegensatz zur vorher angenommenen Uroniumstruktur [54]. Kürzlich konnte von HENKLEIN [55] neben HBTU und HATU auch für die Pyrrolidinanaloge HBPPyU (Abb. 3, **3akv**) und HAPPyU (Abb. 3, **3bkv**) [22,56] das Vorliegen der Guanidiniumstruktur nicht nur im kristallinen Zustand sondern auch in Lösung nachgewiesen werden (Abb. 4:).

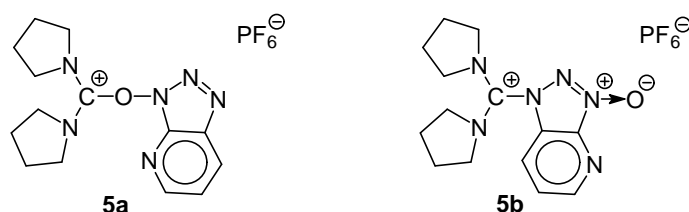


Abb. 4: Uronium- (**5a**) und Guanidiniumstruktur (**5b**) von HAPPyU

Vergleichende Untersuchungen zum Einsatz ausgewählter Reagenzien zur Segmentkondensation in Lösung und an der festen Phase wurden u.a. von KNEIB-CORDONIER et al. [57] mit der Synthese von Human Gastrin I mittels BOP/HOBt und DCC/HOBt, von NOKIHARA [58] bei einer Segmentkupplung des Atrialen natriuretischen Faktors mit BOP vorgenommen. BENOITON [21,59,60] fand auf der Grundlage von Modellstudien, daß DCC/HOBt (in DCM, DMF) in vielen Fällen zu geringerer Epimerisierung führt als BOP/HOBt und HBTU/HOBt.

Im Gegensatz zur Carbodiimid-Kupplung erlaubt die Verwendung von Uroniumsalzen eine schnelle Aktivierung in polaren Lösungsmitteln [50,61]. Jedoch wurde auch hier eine beträchtliche Epimerisierung im Verlauf von Segmentkupplungen beobachtet [21,48]. Keine entscheidenden Unterschiede im Grad der Epimerisierung wurden beim Vergleich der Kupplung via BOP/HOBt und HBTU/HOBt in DMF gefunden [21], jedoch ist die Anwendung von BOP von Nachteil, da während der Reaktion kanzerogene Nebenprodukte, wie Hexamethylphosphorsäuretriamid, gebildet werden. Mit den von CARPINO eingeführten, hoch reaktiven OAt-Uroniumsalzen wurde an verschiedenen Segmentkupplungen in Lösung [22,52] und am Harz [62] ebenfalls Epimerisierung detektiert, wenngleich sie im Vergleich zu den entsprechenden OBt-Reagenzien deutlich gesenkt wurde. Der Verlust der chiralen Integrität in diesen Fällen ist auf die intermediäre Bildung des 5(4H)-Oxazolons zurückzuführen [3,21] (Kapitel 1.3.). Das Ausmaß der Stereomutation kann durch die Verwendung einer geringeren Menge des für die Aktivierung essentiellen

tertiären Amins und durch die Addition bestimmter N-Hydroxyverbindungen, wie z.B. HOBT, verringert werden [60]. Letzteres beschleunigt die Bildung des intermediären Aktivesters, der ohne Verlust der chiralen Integrität koppelt. Zusätzlich bewirken diese sauren Additive eine Verminderung des nachteiligen Einflusses der tertiären Base [45]. Das Ausmaß der Stereomutation kann auch durch die Verwendung sterisch gehinderter tertiärer Amine, wie z.B. Collidin, verringert werden [22].

Neue Kupplungsreagenzien für die Peptidsegmentkondensation auf der Basis der Uroniumstruktur und Phosphoniumstruktur sowie Phosphate und Sulfonate wurden kürzlich von GRIEHL [63] anhand von Modelluntersuchungen hinsichtlich Umsatz, Epimerisierungsgrad und Reaktivität mit den konventionell verfügbaren Reagenzien verglichen. Bei Anwendung dieser Reagenzien in DMF wurde jedoch beträchtliche Epimerisierung beobachtet. Es ist somit ungeklärt, inwieweit sie eine praktikable Alternative zu derzeit in der Segmentkondensation angewendeten Kupplungsmethoden darstellen.

Als Alternative zur Kupplung mit Uroniumsalzen wurde von BENOITON gefunden, daß sich optisch reine ONSu-Ester via Mischanhydrid herstellen lassen [59,64]. Bereits ANDERSON [65] beschrieb den epimerisierungssenkenden Einfluß von HONSu bei der Kupplung von Peptidsegmenten durch Mischanhydride. Dabei sind die Wahl des Chlorameisensäureesters, das Einhalten einer bestimmten Temperatur und Aktivierungszeit zur Bildung des Mischanhydrids, die Natur der tertiären Base und das Lösungsmittel von entscheidender Bedeutung, um einen optimalen Verlauf der Mischanhydridsynthese mit möglichst geringer Epimerisierung und ohne Nebenreaktionen, wie die Urethanbildung, zu gewährleisten [66,67]. Diese Methode ist auf die Anwendung in unpolaren Lösungsmitteln beschränkt, da in DMF mehr Epimerisierung gefunden [66-68] und Nebenreaktionen von DMF mit Chlorameisensäureestern beschrieben wurden [69].

Die kürzlich eingeführten Fmoc-Aminosäurefluoride gelten als effiziente Aktivierungsspezies für die Peptidsynthese in Lösung und an der festen Phase (mit Ausnahme von Arg und His) [70,71]. Besonders geeignet erwiesen sie sich für die Kupplung aufeinanderfolgender sterisch gehinderter Reste, wie α,α -Dialkylaminosäuren [71]. Interessant bei der Verwendung geschützter Aminosäurefluoride ist, daß sie keine Hilfsbase zum Binden der HF im Kupplungsschritt benötigen [72]. Bisher gibt es keine Untersuchungen zur Anwendung der Säurefluoridaktivierung in der Peptidsegmentkondensation.

Die Entwicklung von epimerisierungsarmen Kupplungsmethoden für die Peptidsegmentkondensation in polaren Lösungsmitteln setzt das Verständnis der Ursachen der

Epimerisierung voraus. Dazu notwendige systematische, vergleichende Studien der einzelnen Kupplungsmethoden in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen wurden bisher nicht publiziert. Es wurden lediglich verschiedene Kupplungsverfahren an unterschiedlichen Segmenten erprobt und diskutiert, ohne daß sie in vergleichenden Untersuchungen gewertet worden sind.

1.5. Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung neuer sowie die Analyse und Optimierung bestehender Kupplungsmethoden, um eine epimerisierungsarme Peptidsegmentkondensation zu gewährleisten. Ausgangspunkt soll dabei die Anwendung der Uroniumsalz-Methode bilden. Die Kenntnis der dabei auftretenden epimerisierungsinduzierenden Intermediärprodukte soll zu Möglichkeiten der Unterdrückung der Stereomutation führen. Diese Strategie erfordert die Untersuchung der folgenden Teilaufgaben:

- Auftreten und Bedeutung einer O-Acyluroniumstruktur im Aktivierungsschritt,
- Systematische Modelluntersuchungen zur Oxazol- und Aktivesterbildung bei Verwendung von Uroniumsalzen mit unterschiedlichen Abgangsgruppen,
- Einfluß von Oxazol- und Aktivesterbildung auf das Ausmaß der Epimerisierung.

Die Untersuchungen sollen sich auf Derivate beschränken, die als Aktivesterkomponenten OBt, OAt, ONSu und ONB enthalten (Abb. 3). Uroniumsalze mit OBt als Abgangsgruppe sind bewährte Kupplungsreagenzien besonders für die schrittweise Peptidsynthese. Eine höhere Effektivität hinsichtlich der Kupplungsausbeute und der Vermeidung von Nebenreaktionen zeigen die neueren OAt-Derivate. Von Interesse sind außerdem die entsprechenden ONSu- und ONB-Derivate, da sich für erstere gemäß den Untersuchungen von BENOITON [59,64] der gebildete korrespondierende Aktivester epimerisierungsfrei kuppeln läßt.

Ausgehend von der Kenntnis der Zusammenhänge zwischen aktivierten Spezies und Epimerisierung sollen weiterhin untersucht werden:

- die Mischanhydridmethode unter Verwendung neuer Aktivierungsreagenzien,
- die *in situ* Synthese und Kupplung geschützter Peptidfluoride,
- die Effektivität der Epimerisierungssenkung durch Zusatz saurer Additive im Verlauf der Segmentkupplung mittels Uroniumsalzen.

2. Uroniumsalze für die Peptidsegmentkondensation

2.1. Epimerisierung bei Anwendung von bekannten Uroniumsalzen

Um Ansatzpunkte für optimierte Kupplungssysteme unter Verwendung von Uroniumsalzen zu finden, wurden systematisierende Untersuchungen hinsichtlich des Epimerisierungsgrades bei Anwendung einiger repräsentativer Vertreter der Uronium- und Phosphoniumsalze zur Segmentkondensation durchgeführt. Für diese Untersuchungen wählten wir das Modellsystem Z-Gly-L/DAla-Leu-OBn nach IZUMIYA [73] aus. Nach Untersuchungen von BENOITON [21] und MIYAZAWA [74] ist in diesem System Alanin am C-Terminus der Carboxykomponente des Modells vergleichbar epimerisierungssensitiv wie Valin.



Die Bestimmung des Anteils an LDL-Isomer wurde mittels HPLC durchgeführt (Abb. 5).

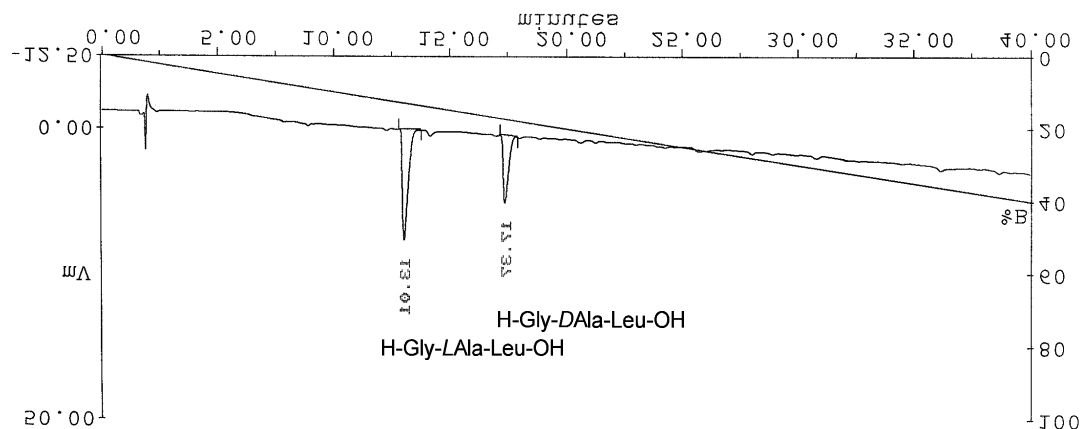


Abb. 5: HPLC-Profil der Trennung von H-Gly-L/DAla-Leu-OH

Unter Verwendung verschiedener Kupplungsreagenzien in Gegenwart von 2 Äq. DIEA wurde Epimerisierung in jedem Fall gefunden (Tab. 1).

Tab. 1: Epimerisierung am Modellpeptid H-Gly-Ala-Leu-OH bei Anwendung verschiedener Kupplungsreagenzien

				Anteil an LDL-Isomer in (%)
TBTU	(Abb. 3, 3aiu)	[20]		2,8
TBPyU	(Abb. 3, 3aiv)	[51]		2,6
HAPyU	(Abb. 3, 3bkv)	[22,56]		1,9
TOPPipU	(Abb. 3, 3ciw)	[51]		4,9
TNTU	(Abb. 3, 3eiu)	[20]		18,6
PyBOP	(Abb. 3, 4akv)	[75]		2,4

Die Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit, daß nach Möglichkeiten zur Unterdrückung der Epimerisierung gesucht werden muß. Ein erster Ansatzpunkt dazu wäre die Änderung der Uroniumstruktur.

2.2. Modifikation der Uroniumstruktur

Anknüpfend an die Verwendung der hochreaktiven Fmoc-Aminosäurefluoride [76] (Kapitel 1.4.) erschien eine Kupplung via Peptidsegmentfluorid als interessanter Ansatz. Eine Änderung der Uroniumstruktur (Abb. 3, **3**) mit der Einführung von F⁻ als Abgangsgruppe würde zur *in situ* Bildung eines aktivierten Peptidsegmentfluorids als reaktives Intermediat im Aktivierungsschritt führen.

Mit diesem Hintergrund wurde von uns parallel zu Untersuchungen von CARPINO [76,77] eine neue Klasse von Kupplungsreagenzien, die Fluoroformamidiniumsalze, entwickelt [78]. Die Synthese des Bipyrrolidinofluoroformamidiniumhexafluorophosphates (Abb. 6, **6b**) bzw. Biperidinofluoroformamidiniumhexafluorophosphates erfolgte aus den korrespondierenden Chloroformamidiniumhexafluorophosphaten [20,50,79] (Abb. 6, **6a**).

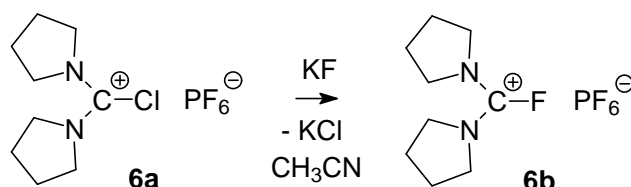


Abb. 6: Reaktion der Chloro- zu den Fluoroformamidiniumsalzen am Beispiel von Bipyrrolidinofluoroformamidiniumhexafluorophosphat (**6b**)

Die nach der Umsetzung mit trockenem KF in Acetonitril als Endprodukte isolierten Fluoroformamidiniumhexafluorophosphate sind kristalline Verbindungen, die an der Luft über längere Zeit stabil sind. Die Charakterisierung der synthetisierten Fluoroformamidiniumhexafluorophosphate erfolgte mittels ES-MS, ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Die Bestimmung der Epimerisierung bei der Kupplung von Z-Gly-Ala-OH an H-Leu-OBn mit Bipyrrolidinofluoroformamidiniumhexafluorophosphat bzw. Bipiperidinofluoroformamidiniumhexafluorophosphat in DMF in Gegenwart von 2 Äq. DIEA ergab Anteile des LDL-Isomers von jeweils 35 % (HPLC). Bei IR-spektroskopischen Untersuchungen in DCM konnte bei der Aktivierung nur das 5(4H)-Oxazolone ($\nu_{\text{C=O}}$: 1828 cm^{-1}) beobachtet werden und nicht, wie erhofft, das Dipeptidfluorid. Aus diesem Grund erwiesen sich diese Fluoroformamidiniumhexafluorophosphate als ungeeignet für die Peptidsegmentkondensation. Analoge Ergebnisse (LDL-Isomer 32 %, HPLC) wurden bei Anwendung der auf gleichem Weg hergestellten zyklischen Verbindung 1,3-Dimethyl-2-fluoroimidazolidiniumhexafluorophosphat erhalten.

3. Untersuchungen zum Mechanismus der Reaktionen mit Uroniumsalzen

Der Verlust der chiralen Integrität bei Einsatz bekannter Uroniumsalze und modifizierter Reagenzien zur Segmentkupplung erforderte Untersuchungen zum Mechanismus der Aktivierung, um die Ursachen der Epimerisierung zu klären.

Der Verlauf der Aktivierung via Uroniumsalze wurde bereits in der Literatur diskutiert [50,60,80] (Abb. 7):

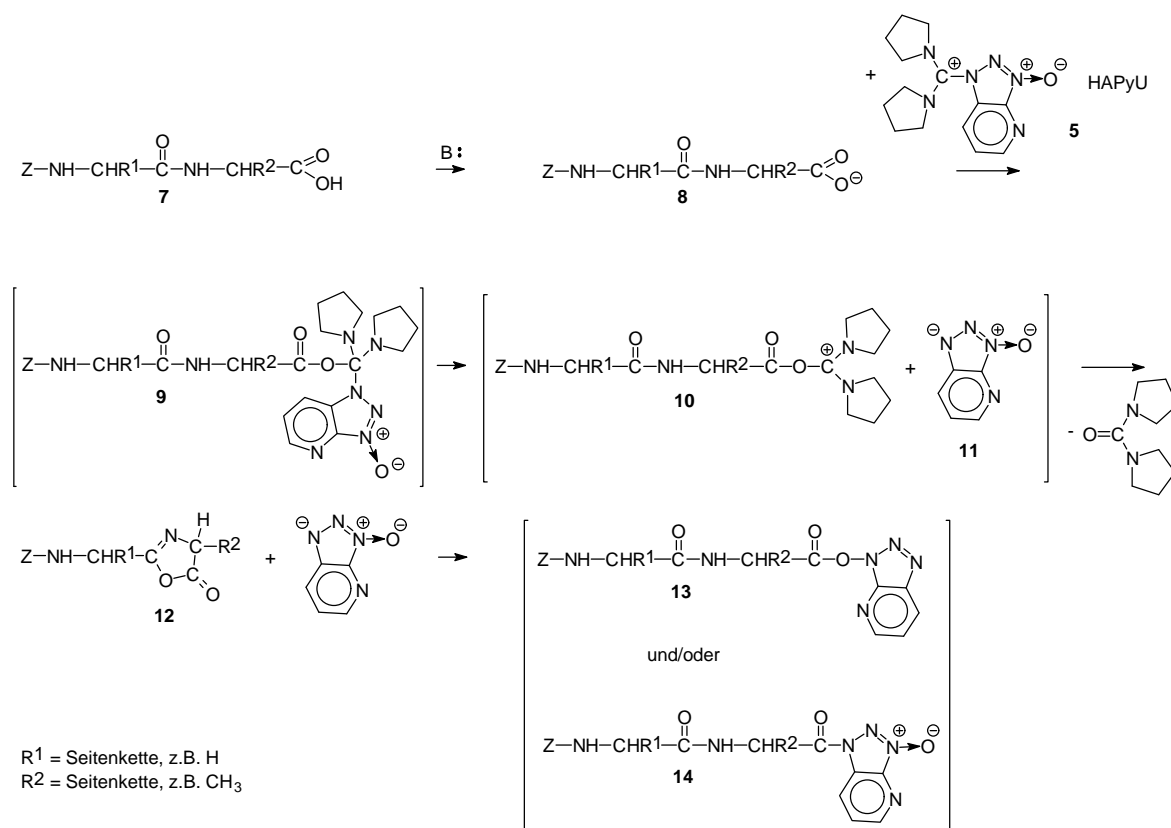


Abb. 7: Vorgeschlagener Mechanismus der Aktivierung von Peptidsegmenten durch Uroniumsalze

Durch Angriff des Carboxylats (Abb. 7, 8) am positiv geladenen C-Atom der Uroniumverbindung 5 bildet sich ein tetraedrischer Übergangszustand 9, aus dem durch gleichzeitiges Austreten des Anions der N-Hydroxyverbindung 11 ein O-Acyluroniumkation 10 entsteht. Dieses reagiert durch basenkatalysierte Abspaltung des Amidprotons und nachfolgenden Ringschluß zum Oxazolon 12. Das Oxazolon wird durch Angriff des Anions der N-Hydroxyverbindung 11 zum korrespondierenden Aktivester 13 bzw. 14 geöffnet.

3.1. Nachweis und Reaktivität der O-Acyluroniumverbindung

Als erster Schritt der Aktivierung wird die Bildung der O-Acyluroniumverbindung als ein vermutlich kurzlebiger Zwischenzustand angenommen. HOEPRICH [81] lieferte einen indirekten Nachweis der O-Acyluroniumstruktur, indem er bei der Aktivierung von zweifach ^{18}O -markiertem Fmoc-Glycin mit HBTU/DIEA das ^{18}O -Isotop im entstehenden Tetramethylharnstoff nachweisen konnte. Kürzlich wurde von COSTE [82] anhand von ^{31}P -NMR-Messungen der direkte Nachweis einer sich intermediär bildenden Acyloxyphosphoniumstruktur bei der Aktivierung der sterisch gehinderten Mesitylencarbonsäure mit Phosphoniumsalzen, wie PyCloP (Abb. 3, **4kv** mit $\text{X}=\text{Cl}$) [79] und PyBOP, erbracht. Bei Übertragung dieser Untersuchungen auf urethangeschützte Aminosäuren konnte er indes nur die Bildung des Tripyrrolidinophosphinoxids ohne Intermediatbildung beobachten. Vergleichbare Untersuchungen zur Aktivierung mit Uroniumsalzen waren bislang nicht bekannt, sind aber zum Verständnis des Reaktionsmechanismus von Bedeutung. Daher soll hier ebenfalls das Modell der Mesitylencarbonsäure ausgenutzt werden. Im Gegensatz zur Peptidaktivierung kann bei Aktivierung der Mesitylencarbonsäure **15** mit Uroniumsalzen keine Oxazolombildung erfolgen, sondern eine auftretende O-Acyluroniumverbindung **17** reagiert unmittelbar mit OAt^- **11** zum Aktivester **18**, wie in Abb. 8 am Beispiel der Aktivierung mit HAPyU **5** dargestellt.

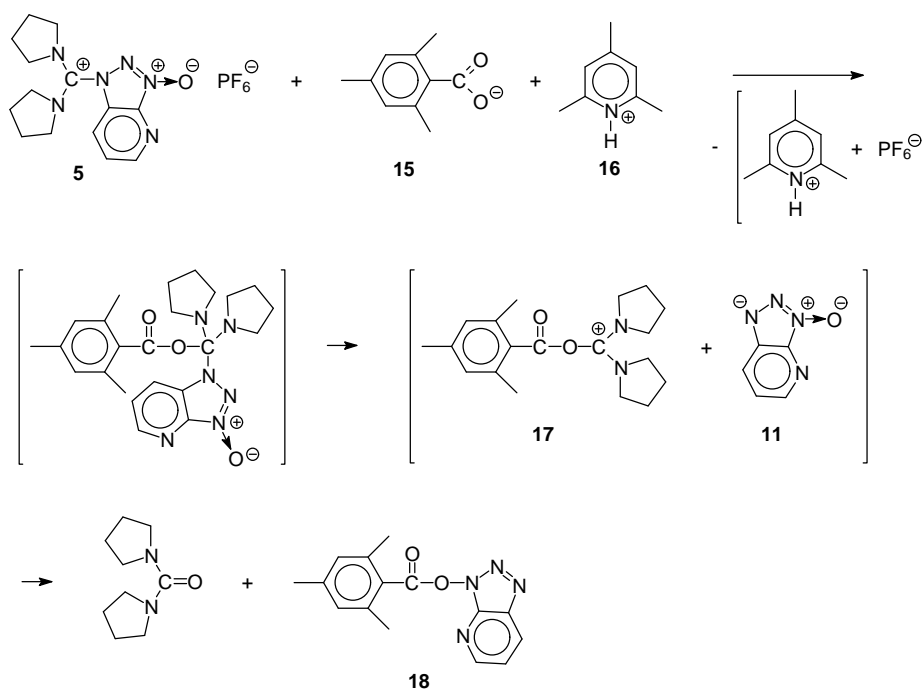


Abb. 8: Mesitylencarbonsäure-Aktivierung unter Verwendung von HAPyU

3.1.1. Mesitylencarbonsäure-Aktivierung als Modell zum Nachweis der O-Acyluroniumverbindung

Als Referenz für mechanistische Untersuchungen der Aktivierung von Mesitylencarbonsäure mit HAPyU wurde das O-Acyluroniumintermediat in Analogie zu TEICHMANN [83] hergestellt (Abb. 9).

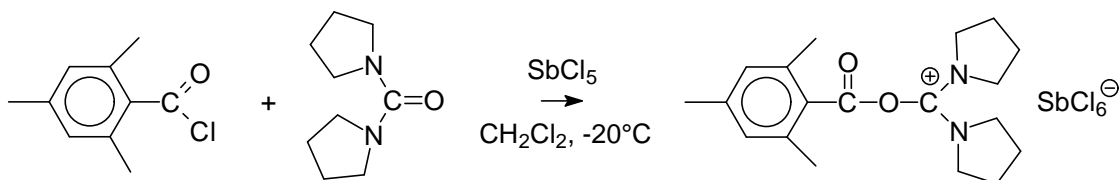


Abb. 9: Synthese von Bipyrrolidino[(mesitylcarbonyl)oxy]uroniumhexachloroantimonat

Das entstehende Bipyrrolidino[(mesitylcarbonyl)oxy]uroniumhexachloroantimonat wurde anhand der Carbonyl-Schwingungsbande (ν_{COC^+} : 1773 cm^{-1}) sowie mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie (^1H : siehe Abb. 10, ^{13}C : δ_{C^+} : $153,2\text{ ppm}$ und Tab. 12 Anhang) charakterisiert.

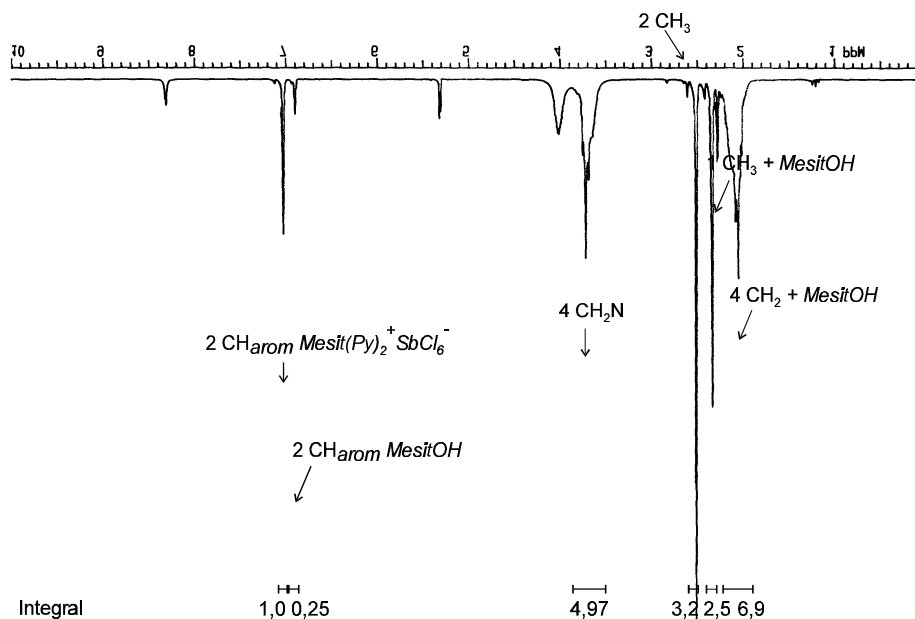


Abb. 10: ^1H -NMR-Analyse des entsprechend Syntheseweg in Abb. 9 dargestellten Bipyrrolidino[(mesitylcarbonyl)oxy]uroniumhexachloroantimonats

Die Aktivierung der Mesitylencarbonsäure (Abb. 8, **15**) mit HAPyU **5** in Gegenwart von 1 Äq. Collidin **16** in CD_2Cl_2 wurde mittels ^{13}C -NMR verfolgt. Bei Raumtemperatur erfolgte innerhalb von 2 min die ausschließliche Bildung des OAt-Esters **18** (^{13}C -NMR-Daten siehe

Tab. 15 Anhang), dessen Identifizierung durch Vergleich mit auf unabhängigem Weg hergestelltem Aktivester durchgeführt wurde. Signale der O-Acyluroniumverbindung konnten nicht beobachtet werden.

Um eine Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen und damit die Möglichkeit der Beobachtung des Intermediates zu verbessern, wurden NMR-Untersuchungen im Temperaturbereich zwischen -50°C und Raumtemperatur durchgeführt. Als geeignete Methode bot sich die ^{13}C -NMR an, da sich die ^1H -Signale im Bereich der aromatischen CH-Protonen (Intermediat, OAt-Ester), der Methylprotonen (Intermediat, OAt-Ester, Collidin, Mesitylencarbonsäure) und Harnstoffmethylenprotonen (Intermediat, protonierter Harnstoff) überlagern.

Zum Vergleich wurde zunächst die Reaktion von Mesitylencarbonsäurechlorid mit Bipyrrolidinoharnstoff unter Zusatz von SbCl_5 (Abb. 9) in CD_2Cl_2 bei tiefen Temperaturen verfolgt (-50°C, -5°C, 20°C) (^{13}C -NMR-Daten siehe Tab. 12 Anhang). Neben der als Hauptprodukt entstandenen O-Acyluroniumverbindung wurde bei -50°C im ^{13}C -NMR-Spektrum noch restliches Säurechlorid identifiziert, welches nach Temperaturerhöhung auf -5°C fast vollständig zum Intermediat reagiert hatte. Mit der Erhöhung der Temperatur konnte eine geringfügige Verschiebung der Linienpositionen im ^{13}C -NMR-Spektrum zu tieferem Feld beobachtet werden.

Die Aktivierung von Mesitylencarbonsäure mit HAPyU/ 1 Äq. Collidin in CD_2Cl_2 im Temperaturbereich zwischen -50°C und 20°C zeigte die sofortige Bildung des Intermediates bei -50°C im Vergleich zur sofortigen Bildung des Aktivesters bei Raumtemperatur (^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen siehe Tab. 13 Anhang, Abb. 11).

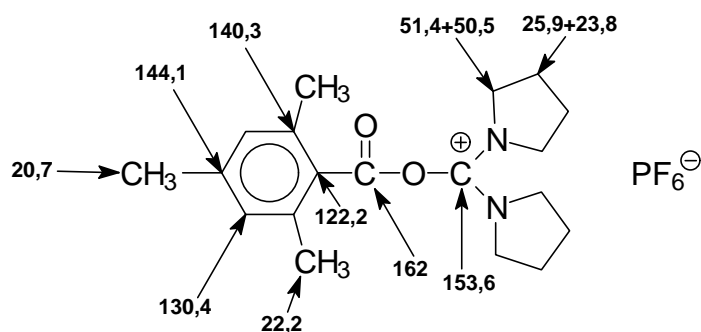


Abb. 11: ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen in ppm von Bipyrrolidino[(mesitylcarbonyl)oxy]uroniumhexafluorophosphat aus der Aktivierung von Mesitylencarbonsäure mit HAPyU in Gegenwart von Collidin in CD_2Cl_2 bei -50°C

Die Reaktionsmischung bei -50°C enthielt außerdem einen Anteil bereits gebildeten OAt-Esters. Infolge der verschiedenen Komponenten im Reaktionsgemisch war die eindeutige Verfolgung der Reaktion der O-Acyluroniumverbindung erschwert. Jedoch war anhand der Peakhöhen deutlich erkennbar, daß sich nach einer Temperaturerhöhung auf -5°C der Anteil an Intermediat erheblich verringerte, während nach Aufheizen auf Raumtemperatur nur noch OAt-Ester in der Reaktionsmischung beobachtet werden konnte.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde im Rahmen der Arbeiten das SbCl₆-Analogon des HAPyU 1-(1-Pyrrolidiny-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylmethyl)pyrrolidiniumhexachloroantimonat-N-Oxid (Abb. 12, **19b**) synthetisiert, um einen direkten Vergleich zur Standardreaktion, der Reaktion von Mesitylencarbonsäurechlorid mit Bipyrrolidinoharnstoff in Gegenwart von SbCl₅ (Abb. 9), in Abhängigkeit der Temperatur herzustellen und damit die Identifizierung mittels ¹³C-NMR zu erleichtern. Die Synthese gelang in Analogie zur HAPyU-Herstellung [22] durch Umsetzung von Bipyrrolidinochloroformamidiniumhexachloroantimonat (Abb. 12, **19a**) mit KOAt in Acetonitril. Die Charakterisierung der Verbindung wurde mittels ¹H- und ¹³C-NMR sowie ES-MS durchgeführt.

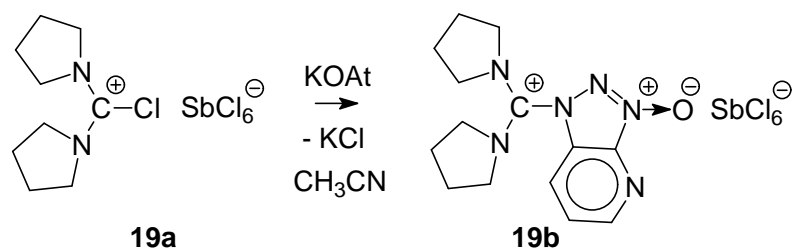


Abb. 12: Synthese von 1-(1-Pyrrolidiny-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylmethyl)pyrrolidiniumhexachloroantimonat-N-Oxid (SbCl₆-Analogon von HAPyU) (**19b**)

Der Einsatz des SbCl₆-Analogons von HAPyU anstelle von HAPyU zur Aktivierung bei erniedrigter Temperatur resultierte in einem besser zu verfolgenden Reaktionsverlauf. Dabei beobachteten wir das Vorliegen der O-Acyluroniumverbindung bei -50°C, mit abnehmender Intensität bei -5°C unter gleichzeitiger Bildung des korrespondierenden OAt-Esters, der bei Raumtemperatur ausschließlich gefunden wurde (Abb. 13, Tab. 14 Anhang) [84].

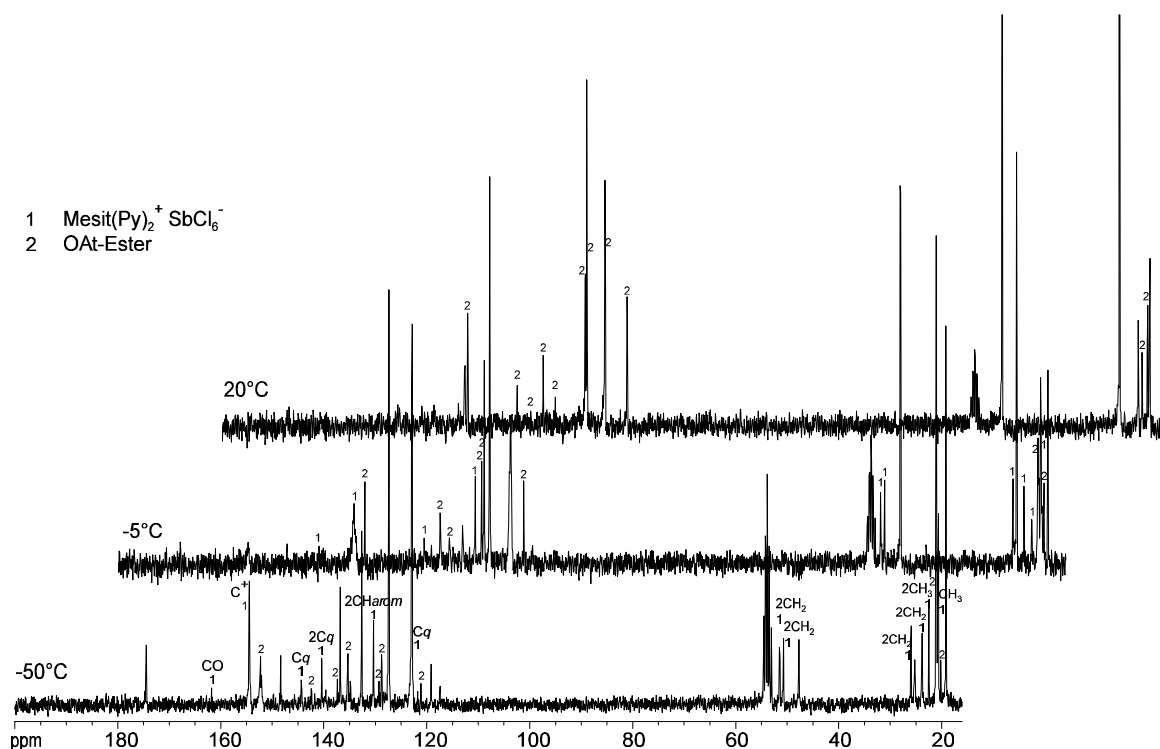


Abb. 13: ^{13}C -NMR-Tieftemperaturuntersuchungen bei -50°C , -5°C und 20°C der Aktivierung von Mesitylencarbonsäure mit 1-(1-Pyrrolidiny-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]-pyridin-1-ylmethyl)pyrrolidiniumhexachloroantimonat-N-Oxid (19b) in Gegenwart von Collidin in CD_2Cl_2

Am Modell der Mesitylencarbonsäure konnte erstmalig auch für Uroniumsalze direkt nachgewiesen werden, daß sich eine instabile O-Acyluroniumsalz-Zwischenstufe als erster Schritt im Verlauf der Carboxyaktivierung bildet. Dieses Intermediat kann unter Freisetzung von Harnstoff zu Oxazol, Aktivester und durch Angriff der Aminokomponente zum Peptid reagieren.

Nach Abschluß dieser Arbeiten wurden von HENKLEIN [85] die vorliegenden Ergebnisse zur Bildung der O-Acyluroniumverbindung am Modell der Aktivierung der Pivalinsäure mit Hilfe von ^1H -NMR-Experimenten bestätigt.

3.1.2. Reaktivität der Aktivderivate der Mesitylencarbonsäure

Im folgenden wurden vergleichende Reaktivitätsuntersuchungen anhand der Aminolyse der Mesitylencarbonsäure-Aktivderivate mit Benzylamin in CD_2Cl_2 bei Raumtemperatur durchgeführt (Abb. 14).

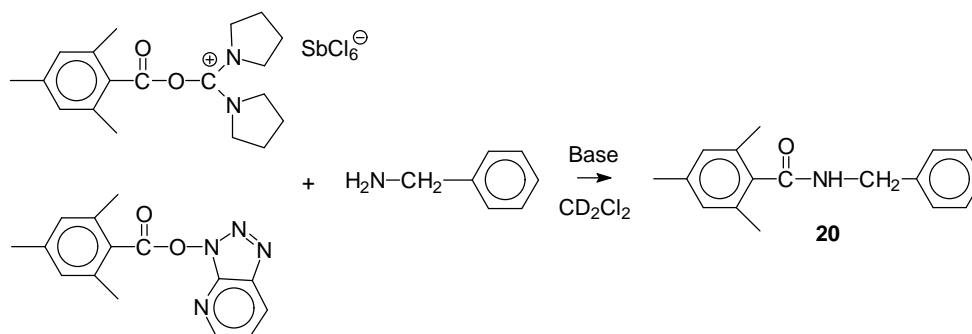


Abb. 14: Modellreaktion zur Untersuchung der Reaktivität der Mesitylencarbonsäure-Aktivderivate

Das als Endprodukt entstehende N(2,4,6-Trimethylbenzoyl)benzylamid (Abb. 14, **20**), notwendig als Referenz, wurde aus der Umsetzung von Benzylamin mit Mesitylencarbonsäurechlorid in Gegenwart von Triethylamin in DCM erhalten und mittels IR (ν_{CONH} : 1630 cm^{-1}) und ^1H -NMR charakterisiert.

Die Ermittlung der Halbwertszeiten $t_{1/2}$ erfolgte durch kinetische ^1H -NMR-Untersuchungen anhand der Abnahme des CH_2 -Singulets von Benzylamin bei δ_{CH_2} : 3,85 ppm und der korrespondierenden Zunahme des CH_2 -Dupletts von N(2,4,6-Trimethylbenzoyl)benzylamid bei δ_{CH_2} : 4,5 ppm.

Tab. 2: Vergleich der Reaktivitäten (bei gleicher Konzentration der Reaktionspartner 1:1) des Mesitylencarbonsäure-O-Acyluroniumintermediates und -OAt-Esters bei der Reaktion mit Benzylamin in CD_2Cl_2 (0,4 M) mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie. Gemessen wurde die Zeit, in der die Hälfte des Ausgangsstoffes reagiert war ($t_{1/2}$).

Aktivderivat	Base zur Aminolyse (1 Äq.)	$t_{1/2}$
Mesit(Py) ₂ + SbCl ₆ -	DIEA	< 1 min 45 s
Mesit-OAt-Ester	DIEA	6 min 40 s

Die Ergebnisse zeigten die höhere Reaktivität des O-Acyluroniumderivates (hergestellt entsprechend Syntheseweg Abb. 9) im Vergleich zum OAt-Ester (Tab. 2).

3.2. Bildung von Oxazolone und Aktivester im Verlauf der Aktivierung von Peptidsegmenten mit Uroniumsalzen

Um den Einfluß der reaktiven Spezies Aktivester und Oxazolone auf die Epimerisierung im Verlauf der Segmentkondensation mit Uroniumsalzen zu verifizieren, wurde die Aktivierung in Abwesenheit der Aminokomponente in Abhängigkeit der Lösungsmittelpolarität, des zugefügten tertiären Amins und der zusätzlichen Anwesenheit von N-Hydroxyverbindungen, wie HOBt, studiert.

Wie von STEINAUER et al. [60] für den Fall der Phosphoniumsalze (BOP) zur Segmentkondensation beschrieben, resultiert die Verwendung von polaren Lösungsmitteln, wie DMF, anstelle von vergleichsweise unpolaren Medien, wie DCM, in einer Erhöhung der Epimerisierung. Generell werden zur Kupplung mit Uroniumsalzen 2 Äq. Base verwendet. Dabei dient ein Äquivalent der Überführung der Säure **7** (siehe Abb. 7) in das Carboxylation **8** und das zweite zum Abfangen der bei der Reaktion entstehenden N-Hydroxyverbindung. Eine Senkung der Epimerisierung kann erreicht werden, wenn nur 1 Äq. Base zur Aktivierung verwendet wird. Jedoch wurden von STEINAUER et al. unter diesen Bedingungen geringere Kupplungsausbeuten beobachtet. Des Weiteren ist eine Reduzierung der Stereomutation nach Addition von HOBt zur BOP vermittelten Segmentkupplung beschrieben worden [45,60].

Ausgehend von diesen Befunden wurden kinetische Untersuchungen zur Aktivierung mit Hilfe der IR- und NMR-Spektroskopie unter Verwendung von Z-Gly-Ala-OH als Modellpeptid durchgeführt.

3.2.1. Aktivierung mit Uroniumsalzen im unpolaren Lösungsmittel

Im allgemeinen wird in unpolarerer Lösungsmitteln geringere Epimerisierung gefunden. Um die Verhältnisse für Uroniumsalze zu beschreiben, wurden repräsentative Vertreter mit unterschiedlichen Abgangsgruppen, wie TBTU, TBPYU, HAPYU und TNTU untersucht.

Im Fall der Aktivierung von Z-Gly-Ala-OH mit TBTU in DCM in Gegenwart von 2 Äq. DIEA bei Raumtemperatur wurde mittels IR beobachtet, daß sich innerhalb weniger Sekunden das Oxazolone bildete. Eine sich in erster Stufe der Aktivierung bildende O-Acyluroniumverbindung wurde erwartungsgemäß nicht beobachtet, in Übereinstimmung mit den Untersuchungen in Kapitel 3.1.1., bei denen selbst unter Verwendung der sterisch

gehinderten Mesitylencarbonsäure das O-Acyluroniumintermediat bei Raumtemperatur nicht nachweisbar war. Die Öffnung des Oxazolons und Weiterreaktion zum korrespondierenden OBt-Ester erfolgte sehr langsam. Nach der ersten Stunde wurde keine signifikante OBt-Esterbildung beobachtet. Wie aus Abb. 15 hervorgeht, ist der Übergang vom Oxazolon zum OBt-Ester an der Verringerung der Intensität der CO-Schwingungsbande des Oxazolons bei $\nu_{\text{C=O}}$: 1828 cm^{-1} [31,82] und dem simultanen Anwachsen der OBt-Ester-Bande bei $\nu_{\text{C=O}}$: 1810 cm^{-1} [40,82,86] erkennbar. Die Charakterisierung erfolgte außerdem mittels ^1H - und ^{13}C -NMR (siehe Tab. 16 Tab. 18 Tab. 18 Anhang).

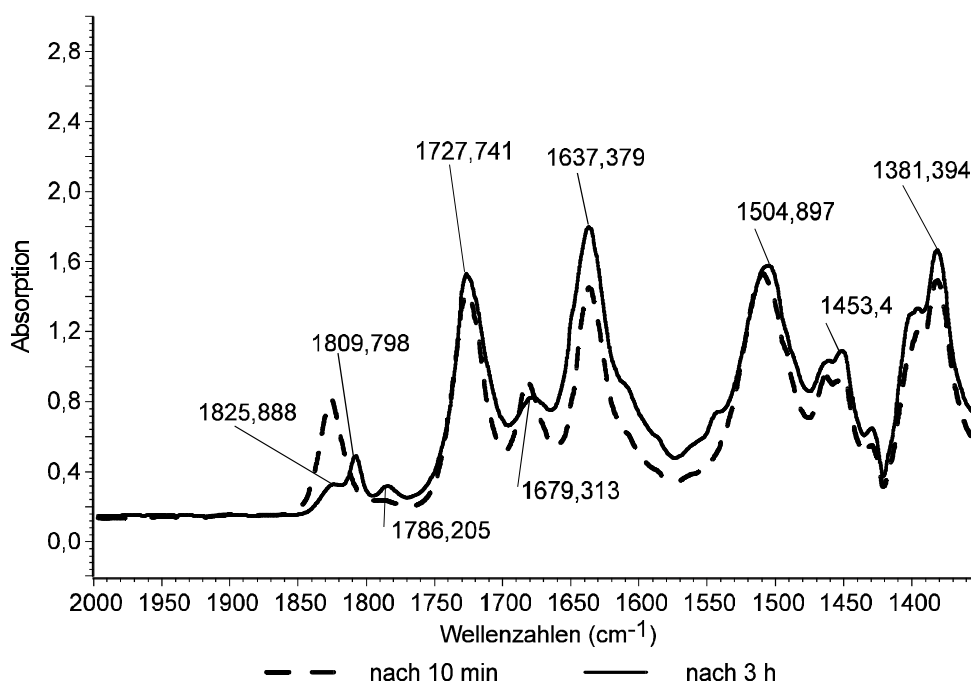


Abb. 15: Aktivierung von Z-Gly-Ala-OH mit TBTU in Gegenwart von 2 Äq. DIEA in DCM (IR)

In Analogie wurde bei Verwendung anderer OBt-enthaltender Uroniumsalze, wie TBPYU, dieselbe Geschwindigkeit der Öffnung des Oxazolons zum OBt-Ester beobachtet. Ähnlich wurde bei Anwendung des von CARPINO [22,56] entwickelten Azabenzotriazol-Derivates HAPyU zur Aktivierung nach einer Beobachtungszeit von 6 h nur Oxazolone gefunden (IR). Daraus folgt, daß eine Segmentkupplung mit TBTU/TBPYU oder HAPyU in DCM unter Zusatz von 2 Äq. Base in erster Linie via Oxazolone verläuft, wobei die Reaktivität des Oxazolons im Vergleich zum Aktivester gering ist (siehe Kapitel 5.1.). Wurde die Menge an zugesetztem DIEA zur Aktivierung mit TBTU auf nur 1 Äq. DIEA reduziert, war die Umwandlung zum OBt-Ester bereits nach 17 min beendet. Ebenso bewirkte die Addition

von 1 Äq. freiem HOBt in Gegenwart von 2 Äq. DIEA zur TBTU-Aktivierung eine beschleunigte OBt-Esterbildung (innerhalb von 20 min) [87].

Im Gegensatz zu den Geschwindigkeiten der OBt- und OAt-Esterbildung resultierte die Aktivierung mit TNTU in DCM in Gegenwart von 2 Äq. DIEA in der Bildung des korrespondierenden ONB-Esters innerhalb von 2 min (IR).

3.2.2. Aktivierung mit Uroniumsalzen im polaren Lösungsmittel

Der Übergang zu polarerer Reaktionsmedien ist, wie in Kapitel 1.2. aufgezeigt, für die Kupplung von Peptidsegmenten wünschenswert. In diesem Zusammenhang wurde die Aktivierung von Z-Gly-Ala-OH in DMF mittels ^1H -NMR-Spektroskopie untersucht.

Im Gegensatz zur Reaktion in DCM bildete sich bei der Aktivierung in DMF in Gegenwart von 2 Äq. DIEA sofort eine Mischung aus Oxazolon und Aktivester (Abb. 16, Tab. 3). Weder für TBTU noch für HAPyU änderte sich das eingestellte Aktivester/Oxazolon-Verhältnis signifikant nach 30 s. Offenbar handelt es sich hier um ein Gleichgewicht, das sich zwischen beiden Aktivkomponenten eingestellt hat [88].

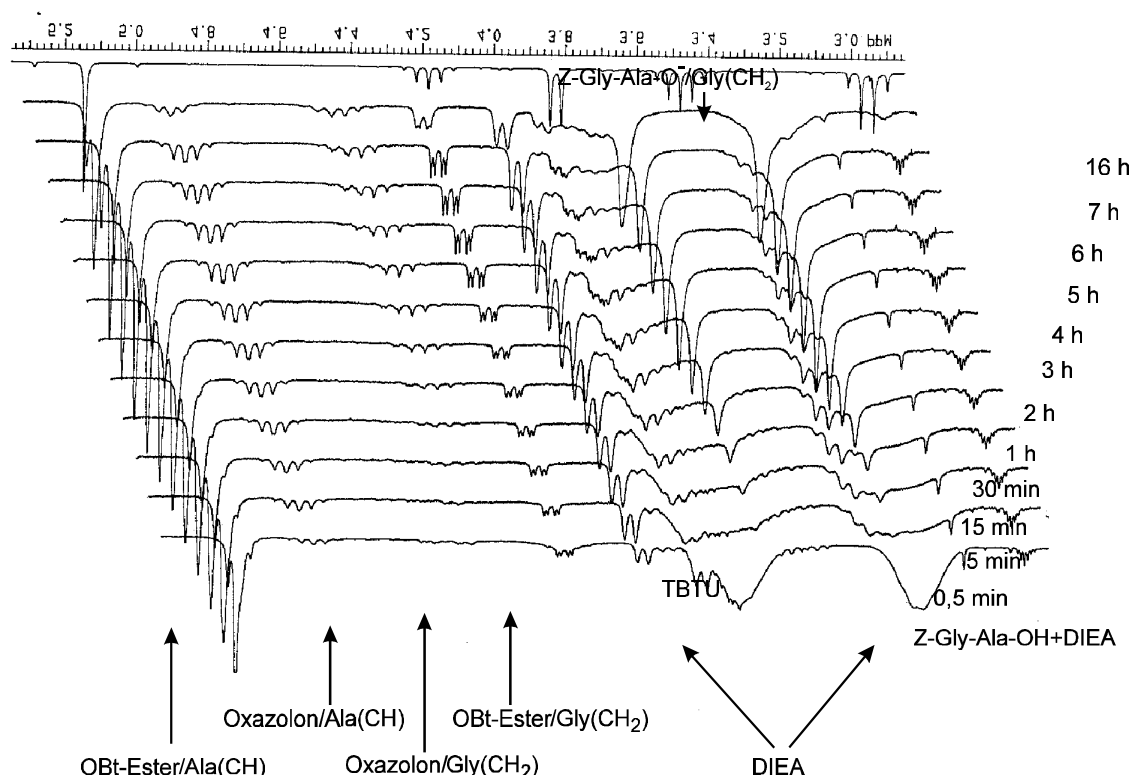


Abb. 16: Aktivierung von Z-Gly-Ala-OH mit TBTU in Gegenwart von 2 Äq. DIEA in DMF- d_7 (^1H -NMR)

Tab. 3: Anteile an gebildetem Z-Gly-Ala-Aktivester und -Oxazolon bei der Aktivierung mit Uroniumsalzen in DMF-d₇ unter verschiedenen Bedingungen (¹H-NMR)

Aktivierungsbedingungen	Zeit (min)	Aktivester (mol-%)	Oxazolon (mol-%)
TBTU + 1 Äq. DIEA	0,5	72	28
	5	79	21
TBTU + 2 Äq. DIEA	0,5	63	37
	5	70	30
TBTU + HOBt + 2 Äq. DIEA	0,5	74	26
	5	79	21
TBTU + HOBt + 3 Äq. DIEA	0,5	71	29
	5	74	26
HAPyU + 2 Äq. DIEA	0,5	34	66
	5	33	67
HAPyU + HOAt + 2 Äq. DIEA	0,5	52	48
	5	53	47
TNTU + 2 Äq. DIEA	0,5	79	21
	5	97	3

Der Zusatz von weniger DIEA (1 Äq.) zur Aktivierung in DMF wie auch die Addition von 1 Äq. N-Hydroxyverbindung (HOBt oder HOAt) resultierte in einer Verschiebung des Aktivester/Oxazolon-Verhältnisses zugunsten des Aktivesters (¹H-NMR).

Das Aktivester/Oxazolon-Verhältnis in DMF änderte sich in Richtung geringerer Oxazolonanteile von 1:1,9 mit HAPyU und 1:0,6 mit TBTU zu 1:0,3 für TNTU. Im Fall von TNTU war die Aktivesterbildung langsamer als mit TBTU und HAPyU, erreichte aber nach 5 min ein konstantes Verhältnis, nahezu vollständig auf der Seite des Aktivesters.

Bei Verwendung von Uroniumsalzen zur Peptidsegmentkupplung tritt generell Peptid-oxazolon in Gegenwart von Base auf, was zur Stereomutation führt.

3.2.3. Untersuchungen zur Ringöffnung des Oxazolons

Wie aus diesen Untersuchungen deutlich wird, entsteht das Oxazolon im Verlauf der Aktivierung via Uroniumsalze in Abwesenheit der Aminokomponente nicht als kurzlebiger Übergangszustand, sondern vielmehr befindet es sich im Gleichgewicht mit dem korrespondierenden Aktivester. Um die Lage des Gleichgewichtes zwischen Aktivester und Oxazolon in Abhängigkeit von Lösungsmittel und Baseneinfluß zu verifizieren, wurde hier in Modellstudien die Ringöffnung des vorgebildeten Oxazolons in Gegenwart verschiedener N-Hydroxyverbindungen (HOBt, HOAt, HONB) untersucht.

Aktivester/Oxazolon-Gleichgewicht

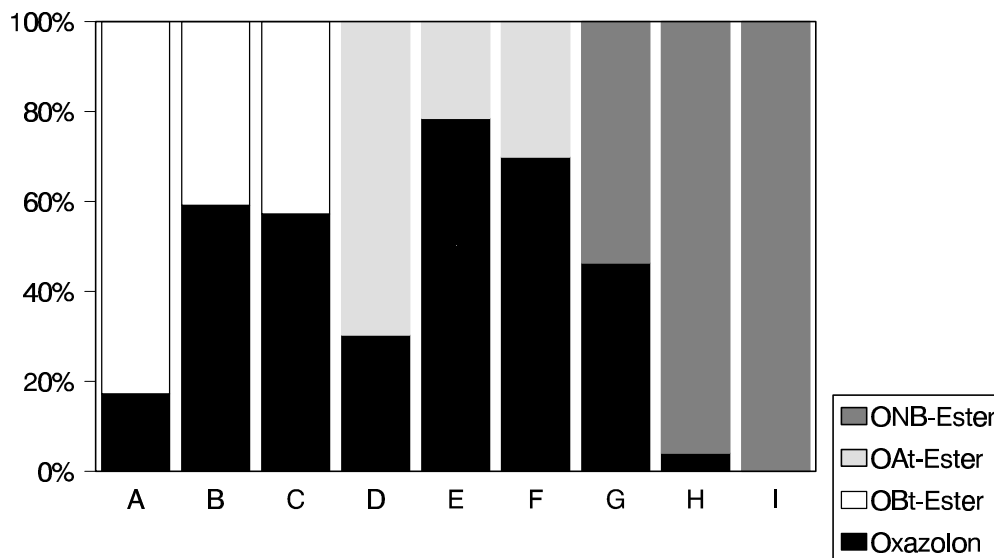
Wurde das Oxazolon mit 1 Äq. HOBt in DCM ohne Zusatz von Base behandelt, bildete sich der korrespondierende OBt-Ester sehr schnell in weniger als 2 min (IR). Eine verbleibende Schulter bei 1828 cm^{-1} im IR-Spektrum zeigte, daß außer dem OBt-Ester noch ein geringer Anteil Oxazolon nach 60 min in der Reaktionsmischung verblieb. Dies steht im Widerspruch zu jüngsten Ergebnissen von BENOITON, der eine vollständige Bildung des OBt-Esters innerhalb von 10 min nach Behandlung des Z-Gly-Val-Oxazolons mit HOBt in CHCl_3 beschrieb [59]. Wurde dagegen anstelle von HOBt eine Mischung aus HOBt/DIEA (1:1) zum Oxazolon in DCM addiert, konnte kein Aktivester im Zeitraum von 30 min beobachtet werden (IR). Dies befindet sich in Übereinstimmung zur Aktivierung mit TBTU, die zu einer nur langsamen OBt-Esterbildung in DCM führte.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Zugabe von HOAt erhalten. Die Bildung des korrespondierenden OAt-Esters erfolgte innerhalb von 2 min (IR). Jedoch wurde in diesem Fall im unpolaren Lösungsmittel ein höherer Oxazolonanteil im Vergleich zur Addition von HOBt beobachtet. Wenn das Oxazolon mit einer Mischung aus HOAt/DIEA (1:1) in DCM behandelt wurde, konnte innerhalb von 2 h kein OAt-Ester gefunden werden (IR).

Im Gegensatz zur langsamen Reaktion des Oxazolons mit HOBt oder HOAt in Gegenwart von DIEA erfolgte die Ringöffnung nach Addition von sowohl HONB als auch HONB/DIEA zum Oxazolon in DCM in beiden Fällen sehr schnell (IR). In Gegenwart des tertiärenamins wurde nur ein sehr geringer Anteil des Oxazolons beobachtet, ein deutlicher Hinweis auf die nahezu vollständige ONB-Esterbildung.

Um die Reaktion des Oxazolons mit HOBt im polaren Reaktionsmedium zu untersuchen, wurde das in DCM synthetisierte Oxazolon mit DMF im Verhältnis von 1:1,3 verdünnt.

30 s nach Addition von 1 Äq. HOBt zum Oxazolon wurde ein OBt-Ester/Oxazolon-Verhältnis von 1:0,2 mittels ^1H -NMR-Spektroskopie beobachtet (Abb. 17), das für mindestens 60 min konstant blieb.



A: Oxazolon + HOBt

B: Oxazolon + HOBt/DIEA

C: OBt-Ester + DIEA

D: Oxazolon + HOAt

E: Oxazolon + HOAt/DIEA

F: OAt-Ester + DIEA

G: Oxazolon + HONB (Das Gleichgewicht ist nach 5 min noch nicht erreicht.)

H: Oxazolon + HONB/DIEA

I: ONB-Ester + DIEA

Abb. 17: Verhältnis der nach 5 min gebildeten Z-Gly-Ala-Aktivspezies unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen (erhalten durch Integration des CH_2 -Dupletts von Glycin aus ^1H -NMR-Kinetikanalysen in $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{DMF-d}_7$)

Zusätzlich zur O-Acylform des Aktivesters konnte in DCM/DMF der NMR-Nachweis für die Gegenwart eines geringen Anteils ($\approx 14\%$) des korrespondierenden N-Acylisomers [40,59,86,89,90] erbracht werden (siehe Abb. 18 und Tab. 17 Anhang). Die hier angegebenen Verhältnisse beinhalten die Summe beider Formen des Aktivesters relativ zur Menge des Oxazolons.

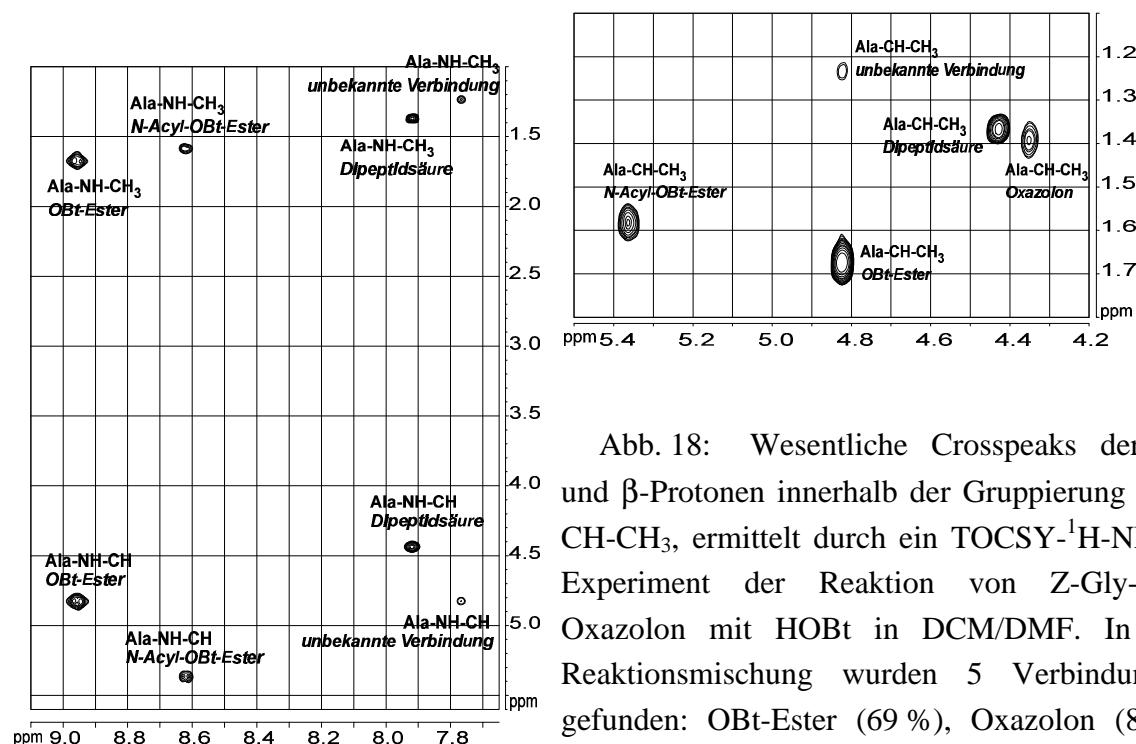


Abb. 18: Wesentliche Crosspeaks der α - und β -Protonen innerhalb der Gruppierung NH-CH-CH₃, ermittelt durch ein TOCSY-¹H-NMR-Experiment der Reaktion von Z-Gly-Ala-Oxazolone mit HOBt in DCM/DMF. In der Reaktionsmischung wurden 5 Verbindungen gefunden: OBt-Ester (69 %), Oxazolone (8 %), Dipeptidsäure (7 %), vermutlich N-Acyl-OBt-Ester (14 %), nicht bekannte Verbindung (3 %). (siehe auch Tab. 17 Anhang)

Außer den Aktivkomponenten wurde entsprechend der ¹H-NMR-Analyse ein Anteil von ca. 10 % Ausgangspeptid beobachtet, der sich im Verlauf der Reaktion erhöhte. Da jedoch das Verhältnis der Aktivspezies innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums konstant blieb, wurde davon ausgegangen, daß das Vorhandensein der Dipeptidsäure mit einer teilweisen Hydrolyse insbesondere des Aktivesters zu begründen ist. Die Anwesenheit der Dipeptidsäure in der Reaktionsmischung wurde daher in den folgenden Diskussionen vernachlässigt.

Unter analogen Reaktionsbedingungen, jedoch in Gegenwart von 1 Äq. DIEA (HOBt/DIEA=1:1), wurde ein OBt-Ester/Oxazolone-Verhältnis von 1:1,4 beobachtet, das ebenfalls innerhalb von 60 min konstant blieb (Abb. 17). Offensichtlich führt die Anwesenheit von DIEA zur Verschiebung des OBt-Ester/Oxazolone-Verhältnisses zugunsten des Oxazolons.

Eine weitere Verschiebung des OBt-Ester/Oxazolone-Verhältnisses konnte durch die Behandlung des Oxazolons (DCM/DMF=1:1,3) mit einem doppelten Überschuß HOBt/DIEA (1:1) erreicht werden. Nach 30 s wurde ein OBt-Ester/Oxazolone-Verhältnis von 1:0,6 beobachtet (¹H-NMR).

Um zu untersuchen, inwieweit ein oxazolonfreies System durch Erhöhung der HOBt-Konzentration in Abwesenheit von Base realisiert werden kann, wurde eine Aktivester/Oxazolon-Mischung (1:0,09), die vorerst in DCM unter Verwendung von 1,2 Äq. HOBt synthetisiert wurde, mit zusätzlichen 0,7 Äq. HOBt in DMF behandelt. Es wurde keine signifikante Änderung des Aktivester/Oxazolon-Verhältnisses beobachtet ($^1\text{H-NMR}$), also kann die Oxazolonbildung in DCM/DMF (1:1,3) so nicht vollständig vermieden werden. Nachteilig bei Verwendung von HOBt-Überschüssen ist außerdem eine Verringerung des Umsatzes infolge einer Protonierung der freien Aminofunktion [46].

Um das Gleichgewicht in DMF von der Seite des Aktivesters zu erreichen, wurde 1 Äq. DIEA zum zuvor in DCM gebildeten OBt-Ester hinzugefügt. Das nach 30 s eingestellte OBt-Ester/Oxazolon-Verhältnis von 1:1,3 ist in Übereinstimmung zum Verhältnis aus der Reaktion des Oxazolons mit HOBt/DIEA ($^1\text{H-NMR}$) (Abb. 17). Die Ergebnisse zeigen, daß der Gleichgewichtszustand aus beiden Richtungen, sowohl von der Seite des Aktivesters als auch von der Seite des Oxazolons, erreicht werden konnte.

In DCM/DMF (1:1,3) wurde mit HOAt (1 Äq.) nach 5 min ein OAt-Ester/Oxazolon-Verhältnis von 1:0,4 erhalten, im Vergleich zu 1:0,2 im Fall von HOBt ($^1\text{H-NMR}$) (Abb. 17). Das Verhältnis blieb für mindestens 60 min konstant. Die Behandlung des Oxazolons mit einer Mischung aus HOAt/DIEA (1:1) bewirkte eine Verschiebung des Verhältnisses zu 1:3,4 ($^1\text{H-NMR}$). Eine ähnliche Position des OAt-Ester/Oxazolon-Gleichgewichtes konnte ebenfalls von der Seite des Aktivesters durch Addition von 1 Äq. DIEA erreicht werden.

Dagegen verlief die ONB-Esterbildung in DCM/DMF (1:1,3) nach Addition von HONB (1 Äq.) zum Oxazolon sehr langsam ($^1\text{H-NMR}$) (Abb. 19). Das ONB-Ester/Oxazolon-Verhältnis erhöhte sich von 1:3,2 nach 30 s zu 1:0,05 nach 60 min. Der Zusatz von HONB/DIEA führte zur Bildung eines Aktivester/Oxazolon-Verhältnisses von 1:0,1 nach 30 s, das sich nach 60 min auf 1:0,02 erhöhte (Abb. 19) ($^1\text{H-NMR}$). Damit wurde gezeigt, daß sich in Gegenwart von Base das Oxazolon nahezu vollständig in den ONB-Ester umwandelt, im Gegensatz zur Ringöffnung des Oxazolons durch HOBt oder HOAt unter analogen Reaktionsbedingungen.

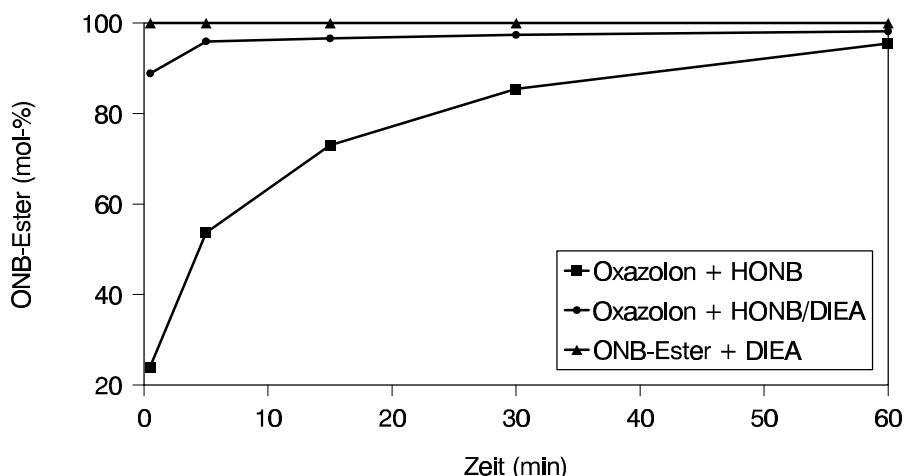


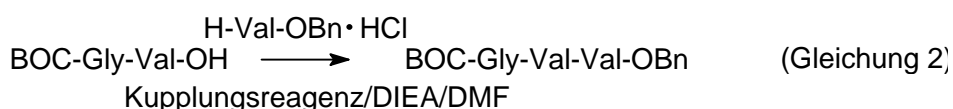
Abb. 19: Ausmaß der Z-Gly-Ala-ONB-Esterbildung unter verschiedenen Bedingungen (erhalten durch Integration des CH₂-Dupletts von Glycin aus ¹H-NMR-Kinetikanalysen in CD₂Cl₂/DMF-d₇)

Folglich wird durch die schnelle Reaktion des Oxazolons in DCM mit HOBt, HOAt oder HONB die Annahme einer säurekatalysierten Oxazolonringöffnung bestätigt. Gleichmaßen erklärt sich die Tatsache, daß die zusätzliche Anwesenheit von Base zu verminderten Ringöffnungen im Fall von HOBt und HOAt führt. Die noch effektive Ringöffnung im Fall der HONB-Addition in DCM in Gegenwart von Base ist vermutlich auf die höhere Basizität von HONB gegenüber HOBt oder HOAt zurückzuführen, unter der Annahme, daß der pK_a-Wert von HONB dem von HONSu (6,09) ähnlich ist und damit höher liegt als die pK_a-Werte von HOBt (4,6) oder HOAt (3,47) [91,92]. Im Gegensatz dazu verlief die Ringöffnung in DMF in Gegenwart von Base schnell. Jedoch kann die beschleunigte Reaktion von HONB durch Addition von Base unter der Annahme einer säurekatalysierten Oxazolonringöffnung nicht erklärt werden. Im Fall von HOBt oder HOAt liegen noch kompliziertere Verhältnisse vor, da unterschiedliche Spezies (O- oder N-Acylform [40,86,89] von OBt oder OAt) in der Reaktionsmischung auftreten können, deren pK_a-Werte nicht bekannt sind.

Bei Zusatz des tertiären Amins (1 Äq.) zum zuvor gebildeten ONB-Ester wurde in DCM eine nur sehr geringe Oxazolonbildung beobachtet (IR). In DCM/DMF (1:1,3) konnte innerhalb von 60 min keine Bildung von Oxazolon gefunden werden (¹H-NMR) (Abb. 19). Wenn diese Ergebnisse allgemeingültig sind und die Oxazolonbildung in Gegenwart von Base vermieden werden kann, ergibt sich daraus ein interessanter Ansatzpunkt für die Entwicklung einer epimerisierungsfreien Segmentkondensation auf der Basis des ONB-Esters.

3.3. Einfluß des Aktivester/Oxazolon-Gleichgewichtes auf das Ausmaß der Stereomutation

Anhand der in Kapitel 2.1. dargestellten Modelluntersuchungen wurde die Menge an LDL-Isomer bei Anwendung der verschiedenen Uroniumsalze bereits untersucht. Um den Einfluß des Aktivester/Oxazolon-Gleichgewichtes auf das Ausmaß der Stereomutation unter den verschiedenen Bedingungen zu verifizieren, wurden mit einem zweiten Modellpeptid Untersuchungen durchgeführt (38):



Die Bestimmung der Epimerisierung und der Ausbeute in Abhängigkeit der Reaktionszeit erfolgte mittels HPLC (Abb. 20).

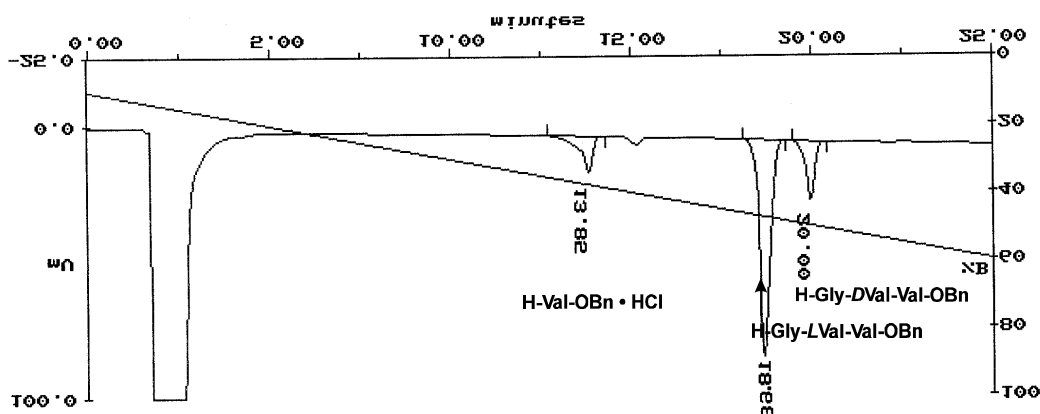


Abb. 20: HPLC-Profil der Trennung von H-Gly-L/DVal-Val-OBn

3.3.1. Epimerisierung der Aktivester

Im Vorfeld der Untersuchungen zu den Uroniumsalzen, die über die *in situ* Bildung von Aktivestern reagieren, wurden die Aktivester selbst hinsichtlich ihrer Epimerisierungstendenz untersucht. Sie wurden via DCC/Additiv in DCM gebildet und danach in DCM/DMF zur Kupplung eingesetzt.

In Abwesenheit des tertiären Amins verlief die Kupplung der Aktivester mit geringer Epimerisierung (Abb. 21). Die Kupplung des ONB-Esters war im Vergleich zu den Fällen der OAt- und OBt-Ester sehr langsam. Die Kupplungsausbeuten unter Verwendung des OAt-Esters lagen fast 20 % höher als die des korrespondierenden OBt-Esters.

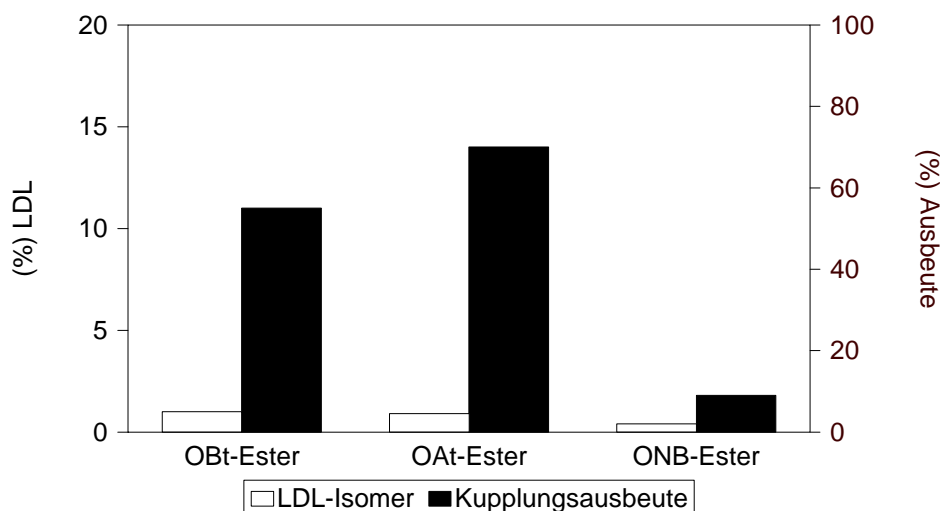


Abb. 21: Ausmaß der Stereomutation nach einer Kupplungszeit von 5 min während der Synthese von H-Gly-Val-Val-OBn unter Verwendung verschiedener Aktivester (DCC/Additiv) in DCM/DMF ohne Zusatz von Base

Um die Bedingungen während einer langsamen Kupplung mittels Uroniumsalzen zu simulieren, wie z.B. das Vorhandensein aktivierter Spezies in Gegenwart von Base, und um Epimerisierung im Modellsystem hervorzurufen, wurden die verschiedenen zuvor gebildeten Aktivester für eine Vorinkubationszeit von 60 s vor Addition der Amino-komponente mit 1 Äq. DIEA behandelt (Tab. 4).

Tab. 4: LDL-Isomerbildung während der Synthese von H-Gly-Val-Val-OBn in DCM/DMF unter Verwendung verschiedener Aktivester (DCC/Additiv), die mit 1 Äq. DIEA für 60 s vorinkubiert worden sind

Kupplungszeit	OBt-Ester	OAt-Ester	ONB-Ester
	LDL / Ausbeute (mol-%)	LDL / Ausbeute (mol-%)	LDL / Ausbeute (mol-%)
10 s	31,0 / 66	18,9 / 85	- / 2
30 s	32,9 / 80	20,0 / 87	- / 6
60 s	33,6 / 84	20,1 / 87	- / 9
5 min	34,2 / 85	20,2 / 87	0,4 / 31
30 min	34,3 / 85	20,3 / 88	1,5 / 72
60 min	34,3 / 86	20,5 / 89	2,6 / 81

Die Einstellung des Aktivester/Oxazolone-Gleichgewichtes ist entsprechend den ^1H -NMR-Untersuchungen innerhalb dieser Zeit abgeschlossen. Der gebildete Oxazoloneanteil im

Gleichgewicht stieg in der Reihenfolge ONB-Ester<<OBt-Ester<OAt-Ester (Tab. 3, Abb. 17), wohingegen ein Anstieg der Stereomutation in der Reihenfolge ONB-Ester<<OAt-Ester<OBt-Ester zu beobachten war (Tab. 4). Obwohl eine höhere Epimerisierung im Fall des höheren Oxazolongehaltes zu erwarten wäre, wurde ein geringerer Anteil LDL-Isomer mit dem OAt-Ester als mit dem OBt-Ester erhalten. Das kann mit der Tatsache zusammenhängen, daß sich zu gleicher Zeit ein größerer Anteil freies HOAt in der Reaktionsmischung befindet, der einen effektiveren Pufferungseffekt bewirkt. Wenn der ONB-Ester in Gegenwart von Base gekuppelt wurde, ist die beobachtete geringe Stereomutation in Übereinstimmung mit dem niedrigen Oxazolongehalt. Die gleiche Reihenfolge der Kupplungsausbeuten ONB-Ester<OBt-Ester<OAt-Ester wurde erhalten wie ohne Anwesenheit des tertiären Amins, aber die Anwesenheit von Base hat eine Beschleunigung der Acylierung der Aktivester zur Folge.

3.3.2. Epimerisierung bei Anwendung der Uroniumsalze

Um die Epimerisierung der korrespondierenden Uroniumsalze und der Aktivester zu vergleichen, wurden die Uroniumsalze zunächst zu „Eintopfreaktionen“ in DMF in Gegenwart von DIEA (2 Äq. zur Aktivierung, 1 Äq. zum Freisetzen der Aminokomponente) eingesetzt. Im Gegensatz zur Reihenfolge der Aktivester stieg der gefundene Anteil LDL-Isomer in der Reihenfolge HAPyU<TBPpyU/TBTU<TNTU (Abb. 22), in Bestätigung der Resultate am Modell Z-Gly-Ala-Leu-OBn (Tab. 1 Kapitel 2.1.) [93].

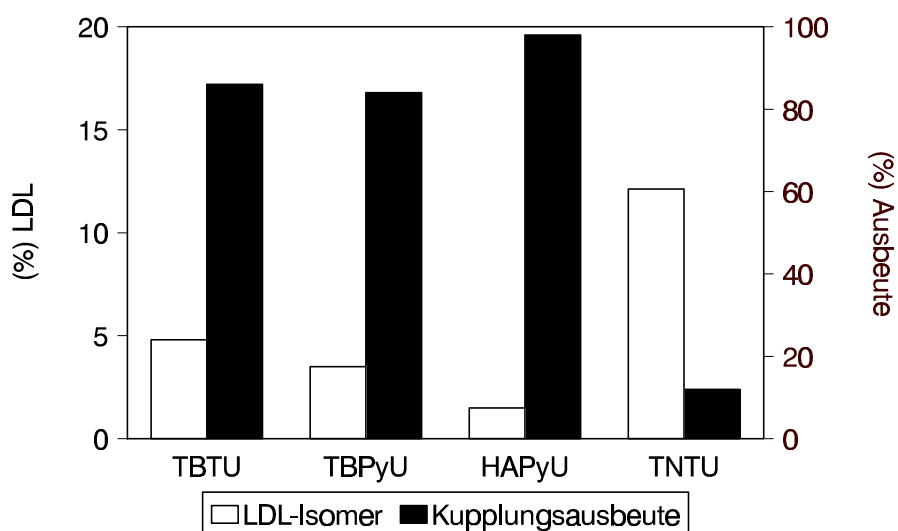


Abb. 22: LDL-Isomerbildung während der Synthese von H-Gly-Val-Val-OBn unter Verwendung verschiedener Uroniumsalze zu „Eintopfreaktionen“ nach einer Reaktionszeit von 60 s

Da sich das Gleichgewicht in Richtung des ONB-Esters im Verlauf der TNTU-Kupplung verschiebt, ist gleichzeitig weniger freies HONB vorhanden, was zu einem geringeren Pufferungseffekt und folglich zu einem höherem Überschuß an freiem DIEA führt (Tab. 5).

Tab. 5: Verhältnis von überschüssiger Base zur Menge an Oxazolon in Abhängigkeit vom Aktivester/Oxazolon-Gleichgewicht (Tab. 3) bei der Dipeptid-Aktivierung in DMF in Gegenwart von 2 Äq. DIEA

Menge des Uroniumsalzes/geschützten Dipeptides	Menge des Aktivesters (Äq.)	Menge des Oxazolons (Äq.)	Menge an freier N-Hydroxyverbindung (Äq.)	Menge an DIEA (Äq.)	resultierender Überschuß DIEA (Äq.)
1 Äq. TNTU	0,8	0,2	0,2	0,8	0,6
1 Äq. HAPyU	0,3	0,7	0,7	0,3	-
1 Äq. TBTU	0,6	0,4	0,4	0,6	0,2

Das Ausmaß der Epimerisierung wird jedoch nicht allein durch die Lage des Aktivester/Oxazolon-Gleichgewichtes bestimmt, sondern auch durch die Geschwindigkeit der Aktivesterbildung und Aminolyse. Die langsamere Bildung des ONB-Esters sowie seine geringe Aminolysegeschwindigkeit im Vergleich zu der des OAt- und OBt-Esters führt zu einer verlängerten Verweilzeit des Oxazolons in Gegenwart überschüssiger Base. Im Gegensatz dazu wird im Fall von HAPyU die Base nahezu durch freies HOAt neutralisiert, was zu minimaler Stereomutation führt (Tab. 5). Zusätzlich verläuft infolge der hohen Aminolysegeschwindigkeit des OAt-Esters und der schnellen Oxazolonringöffnung durch HOAt die Kupplung viel schneller und mit geringer Stereomutation.

Ein größerer Verlust der Konfiguration wurde im Fall einer Voraktivierungszeit von 60 s (zur Simulation der Verhältnisse bei langsamen Kupplungen, Vergleich mit Situation der vorgebildeten Aktivester) beobachtet, aufgrund der erhöhten Oxazolonbildung in Gegenwart von Base. Wie in Tab. 6 aufgezeigt, stieg die Epimerisierung in der Richtung TNTU<HAPyU<TBTU/TBPyU. Bei Verwendung von 2 Äq. DIEA ist der Puffereffekt des freien HOAt nicht ausreichend, um die Epimerisierung im Verlauf der HAPyU-Kupplung mit Voraktivierung zu vermeiden. Die Unterschiede in der Epimerisierung bei Anwendung von HAPyU und TBTU/TBPyU werden auch beeinflusst durch die höhere Aminolysegeschwindigkeit des OAt-Esters relativ zu den OBt-Analoga.

Tab. 6: Ausmaß der Stereomutation während der Synthese von H-Gly-Val-Val-OBn via Uroniumsalz-Aktivierung nach einer Voraktivierungszeit von 60 s

Kupplungs- zeit	TBTU LDL / Ausbeute (mol-%)	TBPyU LDL / Ausbeute (mol-%)	HAPyU LDL / Ausbeute (mol-%)	TNTU LDL / Ausbeute (mol-%)
10 s	31,0 / 79	30,9 / 96	17,6 / 100	14,8 / 2
30 s	32,3 / 97	31,1 / 100		14,3 / 5
60 s	32,3 / 100			16,7 / 11
5 min				16,6 / 41
30 min				16,5 / 90
60 min				16,9 / 99

Die Verwendung von Uroniumsalzen mit unterschiedlichem Harnstoffteil (TBTU, TBPyU, TBPipU) ergab ein ähnliches Ausmaß der Stereomutation, wohingegen von CARPINO und EL-FAHAM [22] mit HAPyU etwas bessere Ergebnisse als mit HATU gefunden wurden. Wenn die zuvor gebildeten OBt- oder OAt-Ester in Gegenwart von 1 Äq. DIEA ohne Vorinkubation gekuppelt wurden (Abb. 23), war das Ausmaß der Bildung an LDL-Isomer ähnlich der beobachteten Menge im Fall der korrespondierenden Uroniumsalze in „Eintopfreaktionen“.

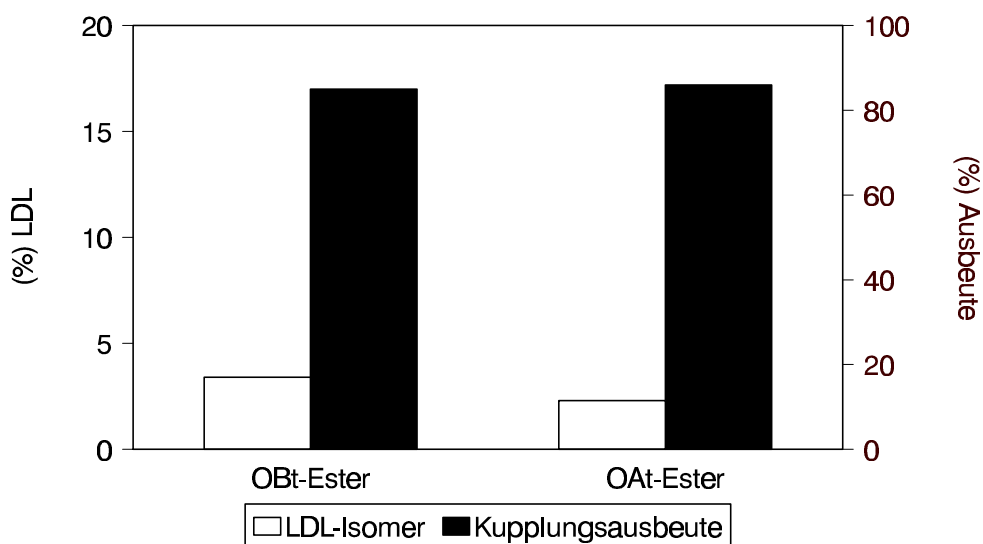


Abb. 23: Ausmaß der LDL-Isomerbildung nach 60 s aus der Synthese von H-Gly-Val-Val-OBn unter Verwendung verschiedener Aktivester, die mittels DCC/Additiv (DCM) synthetisiert und in Gegenwart von 1 Äq. DIEA ohne Vorinkubation in DCM/DMF gekuppelt wurden

Vermutlich reagiert bei der Kupplung mit Uroniumsalzen die im ersten Schritt der Aktivierung entstehende O-Acyluroniumverbindung aufgrund ihrer hohen Reaktivität (Kapitel 3.1.2.) sehr schnell zum Oxazolon. Damit dürfte sowohl die Bildung als auch der Zerfall des Intermediates so schnell verlaufen, daß dessen Beitrag zur Gesamtumsetzung der Reaktion bei den hier durchgeführten Untersuchungen zur Kupplung von Peptidsegmenten nicht nachweisbar war.

3.3.3. Schlußfolgerungen

Wie aus den hier dargestellten Modelluntersuchungen deutlich wurde, führt im Verlauf der Segmentkondensation eine schnelle Aktivierung oder die Anwesenheit eines hohen Anteils an Oxazolon während der Aktivierung nicht zwangsläufig zu einem hohen Grad der Epimerisierung. Ausschlaggebender sind die Geschwindigkeiten der Oxazolonringöffnung und der Aminolyse des Aktivesters sowie die Pufferung der anwesenden Base. Es wurde gezeigt, daß sich mit Uroniumsalzen unter den Bedingungen einer schnellen Ringöffnung des Oxazolons und einer schnellen Aminolyse hohe Kupplungsausbeuten mit geringer Epimerisierung erreichen lassen, wie im Fall der Kupplung mit HAPyU. Jedoch kann die Stereomutation nicht vollständig vermieden werden. Eine effektivere Abpufferung der Base durch saure Additive könnte noch geringere Epimerisierung erwarten lassen.

Ein wesentlicher Schritt zur Optimierung der Uroniumsalzkupplung war der Nachweis eines Aktivester/Oxazolon-Gleichgewichtes bei der Aktivierung von Peptidsegmenten unter Entstehung hoch reaktiver Ester, das in Gegenwart der erforderlichen Base für die Epimerisierung verantwortlich ist. Im Fall der Bildung des weniger reaktiven ONB-Esters mit TNTU verschiebt sich das Gleichgewicht zwar nahezu vollständig zum Aktivester, jedoch ist die Bildung des Aktivesters in Gegenwart von Base relativ langsam, woraus ebenfalls Epimerisierung resultiert. Die Darstellung des ONB-Esters im polaren Lösungsmittel ohne Zusatz von Base ist ein Ansatzpunkt, die Aktivierung ohne Oxazolonbildung und folglich die Segmentkupplung ohne Stereomutation zu ermöglichen.

4. Mischanhydridsynthese

Mischanhydride sind hinsichtlich der Umwandlung zum Oxazolone weniger reaktiv als die O-Acyluroniumion-Intermediate, die während der Aktivierung mit Uroniumsalzen auftreten. Im Fall der Mischanhydrid-Bildung durch Chlorameisensäureester führt die Freisetzung einer starken Säure (HCl) zur vollständigen Neutralisation der anwesenden Base.

Tatsächlich wurde eine erfolgreiche Synthese stereochemisch reiner ONSu-Ester via Mischanhydrid von BENOITON et al. [59,64] beschrieben. Mit diesen wird die Kupplung kürzerer Segmente unter Bildung optisch einheitlicher Peptide ermöglicht. Weitgehend unbeachtet blieb jedoch bei BENOITON's Untersuchungen die Frage nach der Oxazolonebildung.

4.1. Aktivierung mit Chlorameisensäureestern unter Zusatz von N-Hydroxyverbindungen

BENOITON's [64] Methode beinhaltet die Reaktion einer geschützten Peptidsäure (Abb. 24, 7) mit einem Chlorameisensäurealkylester **21a** in Gegenwart eines tertiärenamins (NMM) unter Entstehung des gemischten Carbonsäure-Kohlensäure-Anhydrids **22a**. Das Anhydrid reagiert mit HONSu **23** unter Abspaltung von CO₂ und dem entsprechenden Alkohol zum Aktivester **24**. Dessen weitere Reaktion mit der Aminokomponente **25** führt zum Peptid **26** (Weg 1, Abb. 24) [68].

Weg 1

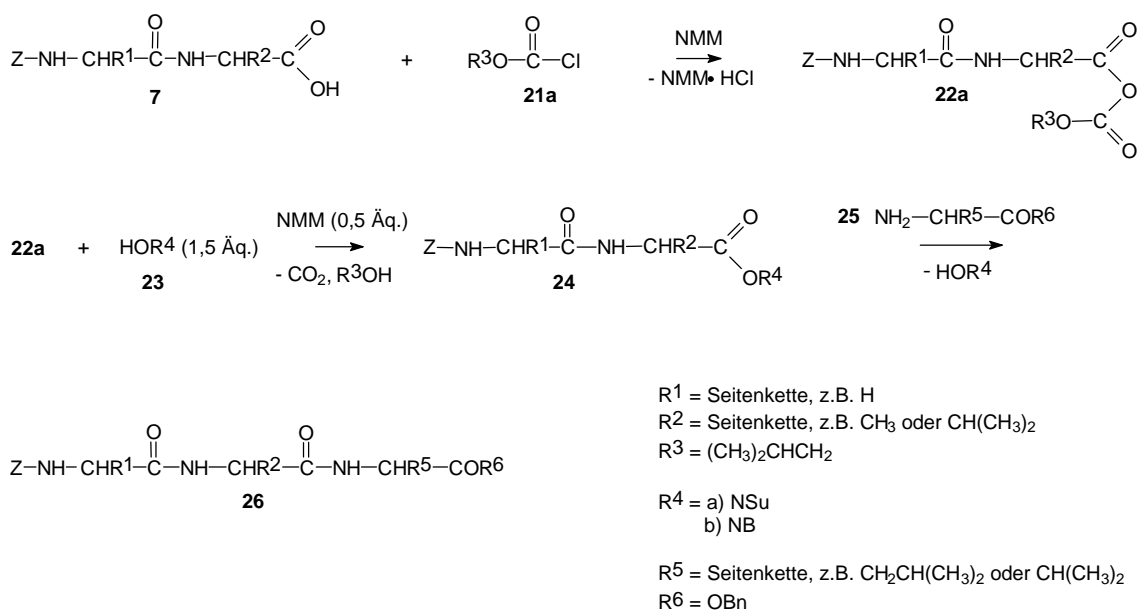


Abb. 24: Peptidkupplung via Mischanhydridsynthese (Weg 1)

Dementsprechend erfolgte die Bildung des Z-Gly-Ala-Mischanhydrids gemäß BENOITON's Methode (Weg 1) mit **21a** in THF bei -13°C unter Verwendung von 1 Äq. NMM innerhalb einer Bildungszeit von 5 min. Nach anschließender Addition von 1,5 Äq. HONSu/ 0,5 Äq. NMM zeigten die IR-spektroskopischen Untersuchungen eine schnelle Bildung des ONSu-Esters (innerhalb von 5 min), erkennbar am Entstehen der charakteristischen CO-Schwingungsbande der Esterbindung bei ν_{CO} : 1816 cm⁻¹ (Tab. 16 siehe Anhang).

Da für HONSu Nebenreaktionen beschrieben worden sind (β -Alaninbildung [37,38], siehe Kapitel 1.4.), wurde im Rahmen der Studien die Verwendung von HONB als alternatives Additiv untersucht und eine vergleichbar schnelle Aktivesterbildung gefunden. Sowohl im Fall von HONSu als auch mit HONB war weder restliches Mischanhydrid anwesend noch wurde Oxazolonbildung beobachtet.

Im Fall der Kupplung von H-Val-OBn an die BOC-Gly-Val-ONSu- oder ONB-Ester bei Raumtemperatur, welche gemäß Weg 1 in Essigester hergestellt worden sind, wurde in Übereinstimmung zu obigen Ergebnissen mittels RP-HPLC eine sehr geringe Stereomutation (unter 0,5 %) beobachtet (Tab. 7).

Tab. 7: Einfluß der entsprechend dem Syntheseweg in Abb. 24 durchgeführten Mischanhydrid-Reaktionen auf die Stereomutation und Kupplungsausbeute während der Synthese von H-Gly-Val-Val-OBn

Kupplungszeit	LDL / Ausbeute (mol-%)	
	21a /HONSu	21a /HONB
5 min	0,2 / 28	0 / 28
30 min	0,3 / 73	0,2 / 74
60 min	0,3 / 85	0,3 / 85

Folglich konnte mit diesen Untersuchungen gezeigt werden, daß auch ONB-Ester, die via Chlorameisensäurealkylester entsprechend der Methode von BENOITON [64] erhalten wurden, ebenso effektiv zur Segmentkupplung eingesetzt werden können wie die ONSu-Ester, jedoch unter Vermeidung der für diese beschriebenen Nebenreaktionen [37,38].

4.2. Aktivierung mit Chlorameisensäureaktivestern

Statt Anwendung von Chlorameisensäurealkylestern [94] wurde der aktivierte Chlorameisensäure-ONB-Ester (ClCOONB) (Abb. 25, **21b**) [95] in ähnlicher Weise zur Bildung von instabilem Carbonsäure-Kohlensäure-Mischanhydrid **22b** [96,97] verwendet. **22b** geht dann im Verlauf einer „Einschritt“-Reaktion unter Verlust von CO₂ in den korrespondierenden ONB-Ester **24** über (Weg 2, Abb. 25).

Weg 2

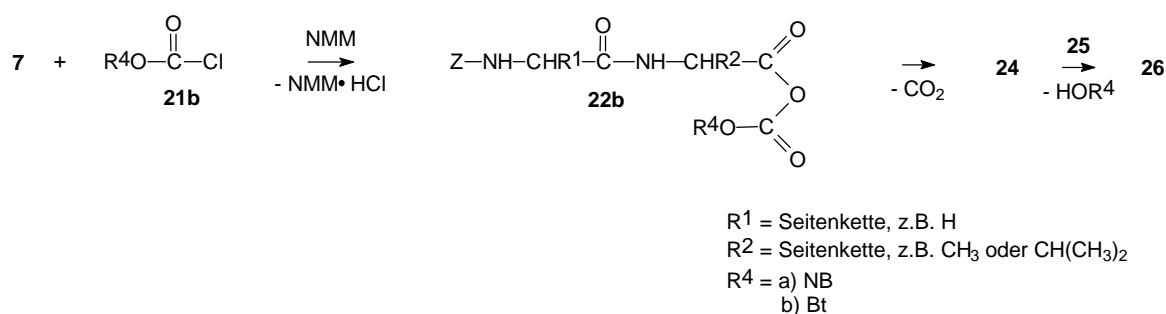


Abb. 25: Peptidkupplung via Chlorameisensäureaktivester (Weg 2)

Unter Berücksichtigung der höheren Reaktivität des OBt- gegenüber dem ONB-Ester wurden die Untersuchungen mit dem analogen, dafür neu entwickelten Chlorameisensäure-OBt-Ester (ClCOOBt) als eine Vorstufe des hoch reaktiven OBt-Esters durchgeführt. Die Herstellung des Chlorameisensäure-OBt-Esters (Abb. 26, **27**) wurde durch Umsetzung von Phosgen mit KOBt in DCM/Toluol als Lösungsmittel unter Einhaltung einer Reaktionstemperatur von 10°C durchgeführt. Das Reaktionsprodukt wurde durch seine IR-Carbonylfrequenz bei 1806 cm⁻¹ (zum Vergleich ClCOONB ν_{OCOCl} : 1819 cm⁻¹, 1736 cm⁻¹) sowie mittels ¹³C-NMR-Analyse charakterisiert.

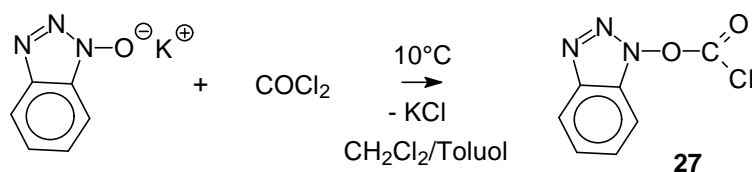


Abb. 26: Synthese von Chlorocarbonyloxybenzotriazol (**27**)

Tatsächlich erfolgte die Reaktion von ClCOOBt **27** mit Z-Gly-Ala-OH in THF in Gegenwart von NMM (1 Äq.) bei -13°C unter Bildung des korrespondierenden Aktivesters ohne signifikante Oxazolonbildung (IR) (Weg 2). In Übereinstimmung dazu steht der geringe

Enantiomergehalt von nur 0,6 %, der nach Voraktivierung von BOC-Gly-Val-OH mit ClCOOBt in Gegenwart von 1 Äq. NMM für 30 min und anschließender Kupplung an H-Val-OBn erhalten wurde (HPLC) (Tab. 8).

Tab. 8: Einfluß der entsprechend dem Syntheseweg in Abb. 25 durchgeführten Mischanhydrid-Reaktion mittels ClCOOBt auf die Stereomutation und Kupplungsausbeute während der Synthese von H-Gly-Val-Val-OBn

Kupplungszeit	LDL / Ausbeute (mol-%)
	ClCOOBt/NMM
5 min	0,4 / 82
30 min	0,5 / 86
60 min	0,6 / 87

4.3. **Schlußfolgerung zur Anwendbarkeit der Mischanhydridsynthese zur Segmentkondensation**

Die Ergebnisse zeigen, daß Peptid-ONB-Ester, die durch Mischanhydridsynthese ohne Oxazolonbildung während der Aktivierung hergestellt worden sind, unter fast vollständiger Vermeidung der Stereomutation gekuppelt werden können. Dies ist auch von BENOITON [59,64] für die korrespondierenden ONSu-Ester gefunden worden. Vorteilhaft bei der Aktivierung über Mischanhydride mittels Chlorameisensäureester ist die effektive Neutralisation der Base durch die freiwerdende HCl. Mit der Entwicklung des Chloro-carbonyloxybenzotriazols als neues Kupplungsreagenz konnte eine verbesserte, einfachere Synthesemethode, ebenfalls ohne signifikante Oxazolonbildung, erhalten werden, um Peptidsegmente mit sehr geringer Stereomutation zu kuppeln.

5. Peptidsegmentkondensation unter Verwendung von Pyridin-poly(hydrogenfluorid)

Wie mit den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt wurde, birgt die Aktivierung von Peptidsegmenten in Gegenwart von Base generell die Gefahr der Epimerisierung. Dies erklärt, warum eine basenfreie Aktivierung, wie die Carbodiimid-Methode, die bislang effektivste Variante zur Unterdrückung der Epimerisierung im Verlauf der Peptidsegmentkondensation darstellt. Eine alternative Kupplungsmethode wäre die Ausnutzung der Säurefluoridaktivierung im Hinblick auf die Verwendung polarerer Lösungsmittelsysteme. Es ist bekannt, daß geschützte Aminosäurefluoride effiziente Acylierungsmittel für die schrittweise Peptidsynthese darstellen [70]. Ein besonderer Vorteil ist, daß die Kupplung auch ohne Anwesenheit von Base durchgeführt werden kann [72]. Das heißt, daß HF als relativ schwache Säure nur eine teilweise Protonierung von Aminokomponenten während der Peptidbindungsbildung bewirkt.

Deshalb erschien es erfolgversprechend, eine Methode auch zur Herstellung geschützter Peptidsegmentfluoride zu entwickeln, um diese nachfolgend zur Kupplung einzusetzen.

5.1. Modelluntersuchungen zur *in situ* Synthese und Kupplung von Peptidsegmentfluoriden

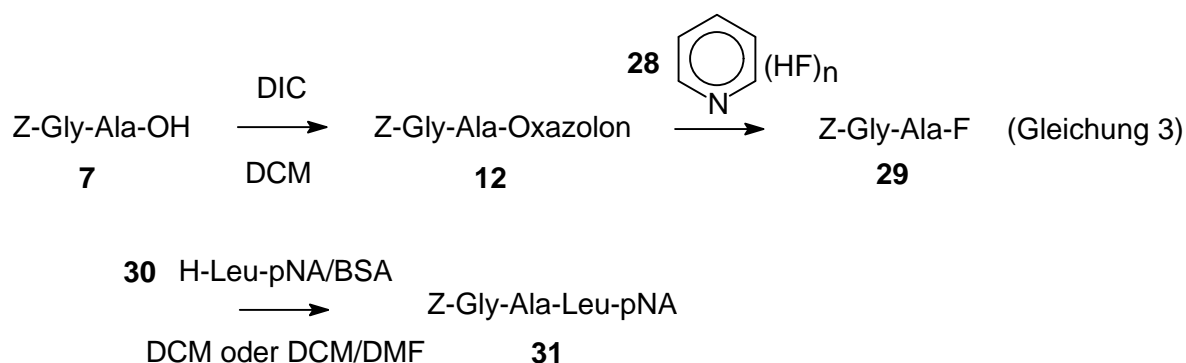
Die von CARPINO [70] entwickelte Methode zur Synthese von Fmoc-Aminosäurefluoriden mittels Cyanurfluorid in DCM ließ sich in modifizierter Weise zur *in situ* Herstellung von Z-Gly-Ala-F anwenden (Hydrolyse von zwei Fluoratomen des Cyanurfluorids, siehe Experimenteller Teil). Dabei wurde aber mittels IR intermediär Oxazolombildung beobachtet. Somit kann aufgrund des anwesenden Pyridins die Gefahr der Epimerisierung bestehen. Es ist nicht gelungen, das gebildete Dipeptidfluorid zu isolieren, um dieses, wie die geschützten Aminosäurefluoride, direkt zur Kupplung einzusetzen.

Kürzlich wurde von KADUK [98] die Herstellung N^α-geschützter Aminosäurefluoride mit Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) beschrieben. Der besondere Vorteil dieser Technik gegenüber der Verwendung von Cyanurfluorid besteht in der einfacheren Aufarbeitung, da bei der Anwendung von DAST nur wasserlösliches Material als Nebenprodukt gebildet wird, welches sich durch Extraktion mit Eiswasser einfach aus dem Reaktionsgemisch entfernen läßt [99]. Die Tatsache, daß zur Fluoridherstellung mittels DAST keine Base

benötigt wird, ließ diese Methode zunächst als geeignet zur Herstellung von Peptidfluoriden erscheinen. Indes zeigten IR-spektroskopische Studien, daß sich nach Einwirkung von 1,2 Äq. DAST auf Z-Gly-Ala-OH in DCM zwar Dipeptidfluorid bildet, nach ca. 15 min jedoch deutlich das Entstehen von Oxazolon ($\nu_{\text{C=O}}$: 1828 cm^{-1}) unter gleichzeitiger Abnahme der FC=O Schwingungsbande des Dipeptidfluorids ($\nu_{\text{C=O}}$: 1847 cm^{-1}) [70] zu erkennen war. Auch nach einer Reduzierung der Menge an eingesetztem DAST (0,33 Äq.) entsteht im o.g. Zeitraum aus dem Säurefluorid Oxazolon. Demzufolge bildet sich bei der Aktivierung mittels DAST im unpolaren Lösungsmittel Peptidoxazolon. Damit ist diese Methode gegenüber der Aktivierung mittels Carbodiimid/HOBt im unpolaren Lösungsmittel von Nachteil, bei der sich der korrespondierende Aktivester bildet.

In Analogie zu sauren Additiven, wie HOAt und HOBt, könnte man sich eine Bildung von Säurefluorid aus dem Oxazolon via Carbodiimid-vermittelte Oxazolonbildung und nachfolgende Addition von HF vorstellen.

Als Modell wurde die Aktivierung von Z-Gly-Ala-OH gewählt. Als HF-enthaltendes Reagenz wurde ein in der Vergangenheit vielfach als Fluorierungsreagenz angewendeter Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplex (49, **28**) eingesetzt, der eine Stabilität bis zu 55°C besitzt und ca. 9 Äq. HF auf 1 Äq. Pyridin (70 % HF, 30 % Pyridin) enthält [100].



Unmittelbar nach Zugabe des Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplexes (5-facher Überschuß HF) zum vorgebildeten Oxazolon (49, **12**), das durch Aktivierung von Z-Gly-Ala-OH **7** mit DIC (1 Äq.) in DCM erhalten wurde, konnte mit Hilfe der IR-Spektroskopie die Bildung des korrespondierenden Dipeptidfluorids **29** beobachtet werden (49, Abb. 27). Das Entstehen von Z-Gly-Ala-F wurde außerdem mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie bestätigt (siehe Tab. 17 Anhang). Die IR-spektroskopischen

Untersuchungen zeigten eine Stabilität des Dipeptidfluorids in DCM über einen Zeitraum von mehr als 1 h ohne erkennbare Bildung von Oxazolon.

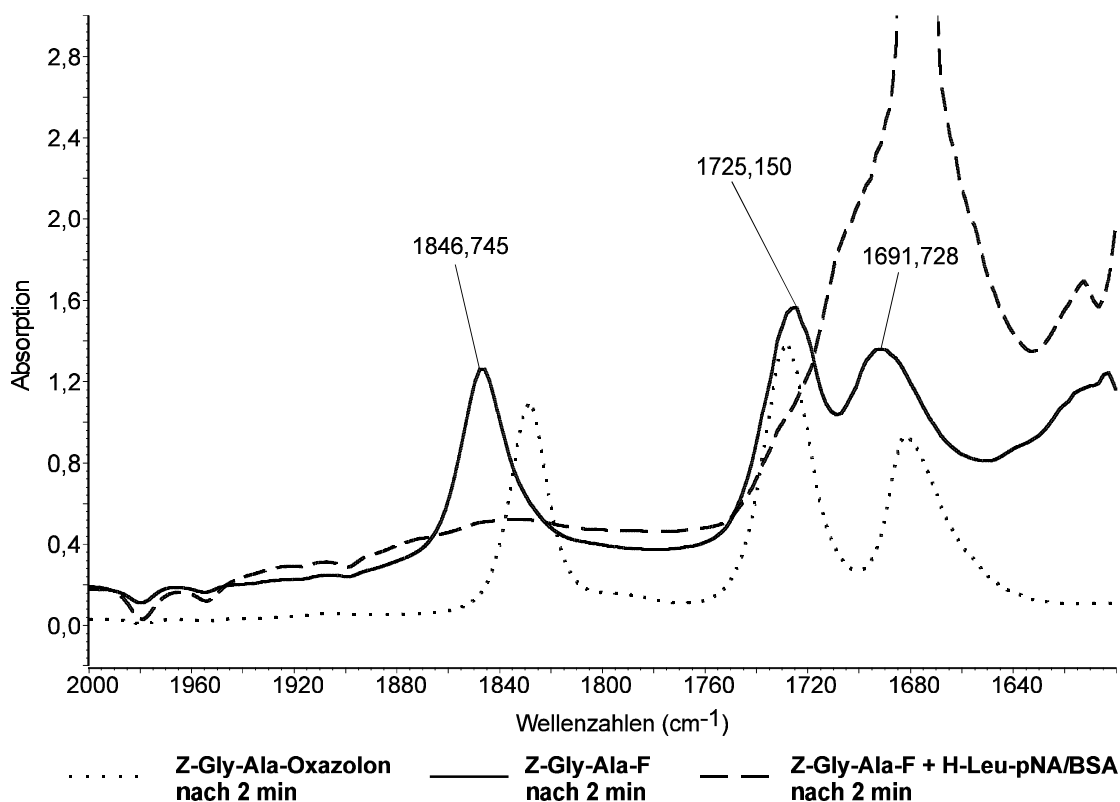


Abb. 27: Bildung von Z-Gly-Ala-F via Oxazolon durch Addition des HF-Additivs sowie Kupplung des Dipeptidfluorids mit H-Leu-pNA (IR)

Die Verfolgung der [2+1]-Kupplung mit 1 Äq. H-Leu-pNA (49, **30**) in DCM in Gegenwart von 1 Äq. BSA als Silylierungsreagenz zeigte das vollständige Verschwinden der IR-Schwingungsbande des Peptidfluorids bei $\nu_{C=O}$: 1847 cm^{-1} innerhalb von 2 min (Abb. 27). Der Zusatz von BSA diente dabei der Verringerung der Basizität der Amino-komponente sowie dem Abfangen der bei der Reaktion freiwerdenden HF unter Bildung von Trimethylsilylfluorid. Kürzlich wurde die Beschleunigung der Acylierung von Aminofunktionen mit sterisch gehinderten Fmoc-Aminosäurefluoriden durch vorherige Behandlung mit Silylierungsreagenzien wie BSA beschrieben [76,101]. Das gewünschte Tripeptid Z-Gly-Ala-Leu-pNA (49, **31**) bildete sich in hoher Ausbeute mit einem LDL-Isomergehalt von nur 0,3 % (HPLC) (Abb. 28, Tab. 9).

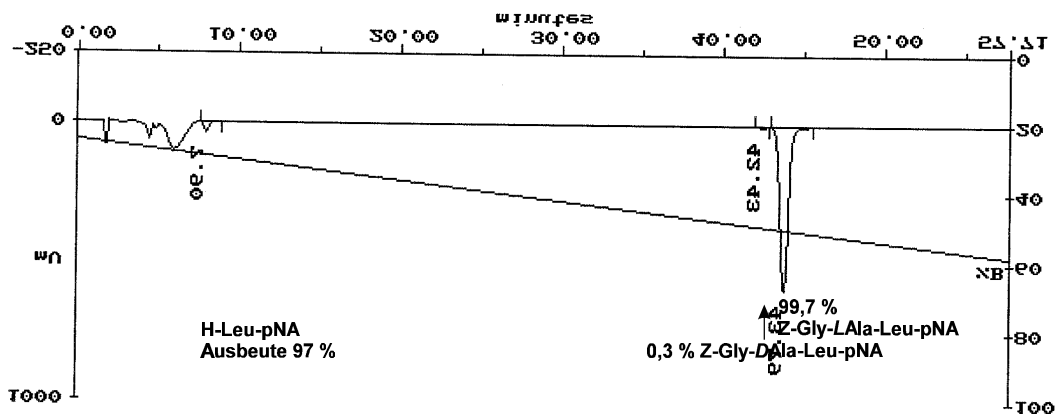


Abb. 28: HPLC-Profil von Z-Gly-Ala-Leu-pNA verunreinigt mit 0,3 % LDL-Isomer aus der Reaktion von Z-Gly-Ala-F (DIC/ 5 Äq. HF-Komplex) mit H-Leu-pNA/ 1 Äq. BSA in DCM

Der geringe Anteil der LDL-Isomer-Bildung konnte unter Verwendung der Methode von KUSOMOTO [102] bestätigt werden. Dabei wurde das Tripeptid in Gegenwart von DCI hydrolysiert sowie nachfolgend die Aminosäuren unter Bildung der N-Trifluoracetyl-isopropylester derivatisiert. Die Bestimmung des D-Alanin-Gehaltes erfolgte mittels GC-MS-Analyse mit einer chiralen Phase.

Im Gegensatz dazu wurde für die DCC-Aktivierung in DMF unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen eine nur langsame Oxazolombildung mittels $^1\text{H-NMR}$ gefunden. Innerhalb von 60 min wurden nur ca. 30 % Oxazolombildung beobachtet. Dieses Ergebnis korreliert mit bereits von HUDSON [45] beschriebenen geringen Geschwindigkeiten von Carbodiimid-Aktivierungen in polaren Lösungsmitteln. Wurde die Reaktion in Gegenwart des HF-Pyridin-Komplexes (5-facher Überschuß) durchgeführt, war weder eine Beschleunigung der Oxazolombildung noch die Bildung von Peptidfluorid zu beobachten ($^1\text{H-NMR}$). Die Ursache dafür beruht möglicherweise auf der Fähigkeit von DMF, HF-Moleküle zu binden, da HF in dipolar aprotischen Lösungsmitteln als schwache Säure ($\text{pK}_a = 15 \pm 2$ in DMSO [103]) fungiert.

Um Peptidfluoride effizient in polarerer Lösungsmitteln zu kuppeln, wurde die Fluoridbildung in DCM und die anschließende Kupplung in DCM/DMF (1:1) durchgeführt. Unter Berücksichtigung der oben angegebenen Reaktionsbedingungen der Z-Gly-Ala-F-Herstellung (1 Äq. DIC, 5 Äq. HF-Pyridin) erfolgte die anschließende Aminolyse mit H-Leu-pNA/ 1 Äq. BSA in DCM/DMF mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit (IR). Das

Tripeptid wurde in 92 %iger Ausbeute mit einem Enantiomergehalt von nur 0,5 % erhalten (Tab. 9).

Im Fall der hier durchgeführten Modelluntersuchungen führte die Peptidaktivierung mit DIC/Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplex zu hohen Kupplungsausbeuten mit geringer Epimerisierung. Vergleichbare Ergebnisse sind unter analogen Reaktionsbedingungen mittels Carbodiimid/HOBt- oder HOAt-Aktivierung unter Bildung und anschließender Kupplung der korrespondierenden OBt- und OAt-Ester erhalten worden (Tab. 9). Bei dieser neuen Methode wird ein einfaches und preiswertes Reagenz anstelle komplexer und kostenaufwendiger organischer Additive, wie HOBt und HOAt, verwendet. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, daß die Säurefluoride in ihren Kupplungseigenschaften den Aktivestern ähnlich sind, jedoch eine höhere Effektivität besitzen [76,104].

Zum Vergleich wurde das Z-Gly-Ala-Oxazolone ohne Zusatz eines Additives unter analogen Bedingungen mit H-Leu-pNA/ 1 Äq. BSA gekuppelt (DCM/DMF = 1:1). Die Aminolyse des Oxazolons verlief im Gegensatz zu den Reaktionen von Säurefluorid und Aktivestern ausgesprochen langsam und unter Verlust der chiralen Integrität (Tab. 9) [siehe auch 28,31,59].

Um den Einfluß eines polaren Lösungsmittelsystems auf das in DCM vorgebildete Dipeptidfluorid (5 Äq. HF-Komplex) zu untersuchen, wurde DMF zugefügt (1:1). Die IR-spektroskopische Beobachtung zeigte nur geringe Oxazolonebildung nach 5 min, ein deutlicher Hinweis darauf, daß Peptidfluoride relativ stabil in solchen Systemen sind. Kein Anstieg der Epimerisierung wurde gefunden im Fall der Behandlung des vorgebildeten Dipeptidfluorids mit DMF (DCM/DMF=1:1) für 1 min, direkt vor der Kupplung mit H-Leu-pNA/ 1 Äq. BSA gelöst in DMF. Innerhalb von 2 min war die Reaktion des vorhandenen Peptidfluorids abgeschlossen (IR). Aufgrund der beibehaltenen sauren Reaktionsbedingungen (Gegenwart von HF) verlief die weitere Reaktion des verbliebenen Oxazolons ohne Epimerisierung (HPLC). Die Ergebnisse in Tab. 9 zeigen, daß die nach 30 min gefundene Umsatzsteigerung im Vergleich zu der nach 2 min gebildeten Menge Tripeptid (primärer Umsatz durch Fluorid) nur noch gering ist. Die niedrigeren Kupplungsausbeuten in DCM/DMF gegenüber den Reaktionen in DCM werden demnach durch die partielle Bildung von Oxazolone verursacht, das eine geringe Reaktivität besitzt.

Tab. 9: Einfluß von HF-Pyridin auf das Ausmaß der Stereomutation und Kupplungsausbeute während der Synthese von Z-Gly-Ala-Leu-pNA unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen

Aktivierungsbedingungen	LDL / Ausbeute (mol-%)	LDL GC-MS (mol-%)
	<i>Kupplungszeit</i> 2 min 5 min 30 min 120 min	
Fluoridbildung in DCM (5 Äq. HF-Pyr); Kupplung an Leu-pNA/BSA in DCM	0,3 / 97	0,3
(1,5 Äq. HF-Pyr); Kupplung an Leu-pNA/BSA in DCM	0,7 / 99	
(1,5 Äq. HF-Pyr); Kupplung an Leu-pNA in DCM	1,0 / 98	
(5 Äq. HF-Pyr); Kupplung an Leu-pNA/BSA in DCM/DMF (1:1)	0,5 / 92	
OAt-Esterbildung in DCM Kupplung an Leu-pNA/BSA in DCM/DMF (1:1)	2,0 / 95 2,2 / 99	
OBt-Esterbildung in DCM Kupplung an Leu-pNA/BSA in DCM/DMF (1:1)	0,6 / 99	
Oxazolonbildung in DCM Kupplung an Leu-pNA/BSA in DCM/DMF (1:1)	3,6 / 11 9,3 / 15 21,6 / 32	
Fluoridbildung in DCM (5 Äq. HF-Pyr)/ Addition von DMF (1:1, 1 min); Kupplung in DCM/DMF (1:2)	0,2 / 60 0,2 / 62 0,3 / 74	

Prinzipiell können geschützte Peptidfluoride im unpolaren Lösungsmittel unter sauren Reaktionsbedingungen durch Zugabe von HF zum Oxazolon synthetisiert werden. Die Kupplung der Peptidfluoride läßt sich ohne signifikante Epimerisierung auch in polaren Lösungsmittelsystemen durchführen.

5.2. Verringerung der Epimerisierung durch Zusatz des Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Additivs zur Kupplung mit Uroniumsalzen

Es ist von großem praktischen Interesse, geschützte Peptidsegmentfluoride in polaren Systemen, wie z.B. DMF, herzustellen. Dieses Ziel läßt sich jedoch nicht mit Hilfe der Carbodiimid-Technik erreichen. Andererseits konnte hier festgestellt werden, daß sich die Reaktion im Fall von Uroniumsalz-Kupplungen auch in Gegenwart des Pyridin-

poly(hydrogenfluorid)-Komplexes durchführen läßt, wobei die gesamte Menge der verfügbaren HF als ein effektiver Puffer wirken kann.

Bei Anwendung von TBPYU zu „Eintopfreaktionen“ in Gegenwart von 2 Äq. DIEA ohne und mit Zusatz von 5 Äq. des HF-Additivs wurde in beiden Fällen innerhalb von 30 min nur geringe Stereomutation gefunden. Deshalb wurde in den folgenden Untersuchungen mit einer Voraktivierung gearbeitet, um Epimerisierung zu provozieren und die Verhältnisse bei langsamen Segmentkupplungen zu simulieren.

Tatsächlich bewirkte die Gegenwart des 5-fachen Überschusses HF-Komplex im Verlauf der HAPyU-Aktivierung in DMF unter Addition von 2 Äq. DIEA für eine Voraktivierungszeit von 60 s eine starke Senkung der Epimerisierung um mehr als 25 % (Tab. 10). Die beobachtete etwas geringere Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Reaktion ohne Zusatz des HF-Additivs ist wahrscheinlich mit einer zumindest partiellen Protonierung der Aminokomponente durch HF zu begründen. Diese Ergebnisse zeigen, daß das Pyridinpoly(hydrogenfluorid)-Additiv ausgezeichnet zur Unterdrückung der Stereomutation im Verlauf langsamer Peptidsegmentaktivierungen mit Uroniumsalzen geeignet ist. Dies initiierte weitere Untersuchungen zur Optimierung der Menge und der Natur der zugesetzten Base. Im Fall der Voraktivierung für 60 s mit HAPyU in Gegenwart von nur 1 Äq. DIEA konnte die gefundene Menge LDL-Isomer von 3 % durch Anwesenheit von 5 Äq. HF-Additiv auf 2 % gesenkt werden (Tab. 10). Eine noch stärkere Unterdrückung der Epimerisierung (0,6 %) konnte durch die Anwesenheit von 10 Äq. des HF-Komplexes erreicht werden.

Wie in jüngsten Untersuchungen berichtet, verläuft die Aktivierung durch Uroniumsalze auch in Gegenwart von tertiären Aminen, die eine geringere Basizität als DIEA besitzen. Entsprechend CARPINO und EL-FAHAM [22] können mit Collidin als Base effiziente Kupplungsergebnisse erreicht werden, allerdings kann der Zusatz von nur 1 Äq. der schwächeren Base zu unvollständigen Kupplungen führen. Im Gegensatz dazu zeigten unsere Ergebnisse, daß bei der Aktivierung mit HAPyU/ 1 Äq. Collidin in Gegenwart des HF-Additivs durchaus vollständige Aktivierungen erzielt werden können. Sowohl Collidin wie auch NMM wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Obwohl NMM (pK_a (H₂O): 7,38) im Vergleich zu DIEA (pK_a (H₂O): 10) eine geringere Basizität aufweist [22], wurde in früheren Untersuchungen ein höherer Grad der Epimerisierung beobachtet [60], was hier bestätigt werden konnte. In Anwesenheit von 5 Äq. HF-Komplex konnte dieser Effekt, wie in Tab. 10 gezeigt, etwas reduziert werden. Demgegenüber wurden bei Einsatz von Collidin

in Verbindung mit dem HF-Additiv unerwartet gute Ergebnisse erhalten. Tatsächlich ergaben Zusätze von 5 oder 10 Äq. des HF-Pyridin-Komplexes im Verlauf der Aktivierung mit HAPyU in Gegenwart von Collidin (1 Äq., 60 s Voraktivierung) hohe Kupplungs- ausbeuten und praktisch keine Epimerisierung (HPLC, GC-MS) (Tab. 10). Nach CARPINO und EL-FAHAM [22] besitzt Collidin (pK_a (H₂O): 7,43) zwar eine ähnliche Basizität wie NMM, jedoch wird nur für ersteres eine ausgeprägte sterische Hinderung gegenüber des Angriffs am C-H von Oxazolon oder Aktivester erwartet, woraus eine Verringerung der Epimerisierung resultiert.

Tab. 10: Einfluß des HF-Pyridin-Additivs und der Base auf die Stereomutation und Kupplungsausbeute während der Synthese von Z-Gly-Ala-Leu-pNA in DMF via HAPyU-Aktivierung mit einer Voraktivierungszeit von 60 s

Base (Äq.)	HF- Komplex (Äq.)	LDL / Ausbeute (mol-%)						LDL GC-MS (mol-%)
		<i>Kupplungszeit</i>						
		<i>10 s</i>	<i>30 s</i>	<i>60 s</i>	<i>5 min</i>	<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	
DIEA (2)	-	31,6 / 99						0,4
DIEA (2)	5	4,8 / 75	4,9 / 84	4,8 / 88	4,5 / 97	4,4 / 100		
DIEA (1)	-	2,7 / 90	3,2 / 99					
DIEA (1)	5		2,4 / 79	2,6 / 84	2,4 / 94	2,3 / 100		
DIEA (1)	10				0,6 / 61	0,5 / 81		
NMM (1)	-	3,9 / 78		6,3 / 93		7,1 / 100		
NMM (1)	5					3,1 / 88		0,8
Collidin (1)	-			0,3 / 71		0,6 / 96	0,7 / 100	
Collidin (1)	5					0,4 / 81	0,5 / 87	
Collidin (1)	10					0,3 / 77	0,3 / 82	0,5

Die Untersuchungen zeigten, daß Kombinationen aus HAPyU/ 1 Äq. DIEA/ 10 Äq. Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplex oder HAPyU/ 1 Äq. Collidin/ 5 oder 10 Äq. Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplex in Zusammenhang mit einer Voraktivierungszeit von 60 s - um Epimerisierung zu provozieren - günstige Bedingungen für eine epimerisierungsarme Segmentkondensation liefern. Besonders bemerkenswert ist dabei die Tatsache, daß trotz

der Anwesenheit eines sauren Additivs hohe Aktivierungsraten erreicht wurden, unter Einsatz einer geringeren Menge tertiären Amins als normalerweise zur Uroniumsalz-Aktivierung verwendet wird. Um vollständige Umsätze zu sichern, war es jedoch notwendig, mit längeren Kupplungszeiten zu arbeiten.

5.3. Nebenreaktionen bei Verwendung des Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Additivs

Saure Reaktionsbedingungen bergen die Gefahr der vorzeitigen Abspaltung sensibler Seitenkettenschutzgruppen trifunktioneller Aminosäuren, wie z.B. Trityl- oder *tert.*-Butyl-Gruppen (BOC, *tert.*-Butylester, *tert.*-Butylether). Infolge der hohen Konzentration an HF, die bei Addition der verschiedenen Mengen des HF-Pyridin-Komplexes während der beschriebenen Reaktionen vorliegt, erwies es sich als notwendig, die Trityl- und BOC-Abspaltung unter den Bedingungen der Kupplungsreaktionen zu untersuchen, um die Grenzen der Anwendbarkeit des Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplexes zu bestimmen. Tatsächlich wurde bei der Verwendung von 5 Äq. HF-Komplex in DCM eine Abspaltung der Trityl-Seitenkettenschutzgruppe von Fmoc-Cys(Trt)-OH oder Fmoc-Asn(Trt)-OH von ca. 2 % bzw. 0,2 % mittels HPLC-Analyse beobachtet (Tab. 11).

Tab. 11: Ausmaß der Trityl- und BOC-Seitenkettenschutzgruppen-Abspaltung (%) nach Addition verschiedener sensibler Aminosäuren zu HF-enthaltenden Lösungsmitteln (0,1 M)

	Fmoc-Cys(Trt)-OH		Fmoc-Asn(Trt)-OH			Fmoc-Lys(BOC)-OH		
	1,5 Äq. HF-Pyr	5 Äq. HF-Pyr	1,5 Äq. HF-Pyr	5 Äq. HF-Pyr	10 Äq. HF-Pyr	1,5 Äq. HF-Pyr	5 Äq. HF-Pyr	10 Äq. HF-Pyr
Zeit	<i>DCM</i>							
5 min	0,6	2,3	0,1	0,1		1,2	3,3	
30 min	1,6		0,15	0,16				
	<i>DMF</i>							
5 min	< 0,1	0,04						0,19
30 min	< 0,1	0,22	< 0,1	< 0,1	0,1	0,12	0,16	0,26

Die Abspaltung der BOC-Gruppe von Fmoc-Lys(BOC)-OH erreichte unter analogen Bedingungen ca. 3 %. Derartige Nebenreaktionen ließen sich im Fall von

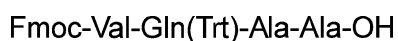
Fmoc-Lys(BOC)-OH durch Verwendung von nur 1,5 Äq. des HF-Pyridin-Komplexes auf 1 % reduzieren (Tab. 11). In diesem Zusammenhang konnte bewiesen werden, daß die Kupplung in Gegenwart dieses reduzierten Betrags des HF-Additivs durchaus zu guten Ergebnissen führt. So ermöglichte die Reaktion von Z-Gly-Ala-F (1,5 Äq. HF-Komplex) mit H-Leu-pNA/ 1 Äq. BSA in DCM den vollständigen Umsatz (99 %) unter Bildung von nur 0,7 % des LDL-Isomers (Tab. 9). Das Ausmaß der LDL-Isomer-Bildung in Abwesenheit von BSA betrug 1 % (Tab. 9). Das heißt, daß die beobachtete höhere Epimerisierung im Vergleich zur Verwendung von 5 Äq. des HF-Komplexes zur Fluoridbildung vermutlich auf die ungenügende Pufferung der Aminokomponente zurückzuführen ist.

Von besonderer Bedeutung für den Einsatz des HF-Additivs im Verlauf der Uroniumsalz-Aktivierung ist die Tatsache, daß die Gefahr der säurekatalysierten Abspaltung von Seitenkettenschutzgruppen in DMF vernachlässigbar gering ist. Dementsprechend blieben die Werte der Trityl- und BOC-Abspaltung dieser drei Aminosäuren im Fall der Behandlung mit 1,5 Äq. des HF-Komplexes unterhalb 0,2 % (HPLC) (Tab. 11). Bei Verwendung von 5 oder 10 Äq. des HF-Additivs stieg der Grad der Abspaltung nicht über 0,3 %. In kritischen Fällen kann anstelle des Trityl-Derivates von Fmoc-Cys-OH das korrespondierende säurestabile (S-tert.-Butylthio)-Cystein eingesetzt werden.

5.4. Übertragung der HAPyU/ HF-Komplex-Kupplungsmethode auf die Segmentkondensation von ACP(65-74)

Um die Anwendbarkeit der HAPyU/ HF-Komplex Methode auf die Segmentkondensation längerer Peptide zu untersuchen, wurde eine Partialsequenz des Acyl Carrier Proteins ACP(65-74) als Modell gewählt. Dieses Peptid wurde neben anderen Verfahren [75,105,106] erfolgreich mittels SPPS unter Anwendung der Fmoc-Aminosäurefluoride am Tenta Gel S PHB Harz [71] synthetisiert. Im folgenden soll der Segmentkupplungsprozeß entsprechend 58 untersucht werden, um

- 1.) den Einfluß des Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplexes auf den Umsatz der [4+6]-Kupplung von ACP(65-74) (58, **34**) sowie
- 2.) den Einfluß des Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplexes auf das Ausmaß der Stereomutation am C-terminalen Alanin der Fmoc-geschützten Carboxylkomponente festzustellen.



(Gleichung 4)

32

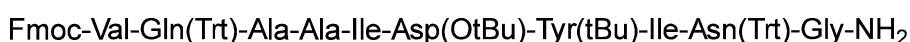


Voraktivierung: 60 s
HAPyU/1 Äq. DIEA/DMF
10 Äq. HF-Pyr



+ H-Ile-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ile-Asn(Trt)-Gly-NH₂/ 1 Äq. DIEA

33



34

Der N-terminale Teil **32** des Peptides **34** (58) wurde manuell unter Anwendung der schrittweisen Methode am o-Chlortritylharz synthetisiert. Die Beladung des Harzes mit Fmoc-Ala-OH erfolgte mittels einer epimerisierungsfreien Anesterungstechnik über das Carboxylat [107]. Die darauffolgenden Kupplungen von Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH sowie Fmoc-Val-OH wurden unter Verwendung von HBTU (1 Äq.) als Kupplungsreagenz in Gegenwart von DIEA (2 Äq.) in Analogie zu Standardsyntheseprotokollen durchgeführt. Die Abspaltung des Tetrapeptides vom Harz erfolgte mit einer Mischung aus DCM/Essigsäure/THF (8:1:1) [107,108]. Die Synthese der C-terminalen Sequenz (58, **33**) wurde am Applied Biosystem 433 A Peptidsynthesizer im Fast MOC-Cycle mit HBTU (1 Äq.) in Gegenwart von DIEA (1 Äq.) am Sieber Amidharz [109] durchgeführt. Hintergrund des Einsatzes dieses Harzes war die Möglichkeit der extrem schwach sauren Abspaltung (1 % TFA), um säurelabile Seitenschutzgruppen, wie Trityl- und *tert.*-Butyl-Gruppen, zu schützen. Die beiden Segmente wurden nach der Synthese mittels HPLC und ES-MS charakterisiert.

Der Einfluß des HF-Additivs auf den genannten Kupplungsprozeß (58) wurde in Analogie zu den in Kapitel 5.2. beschriebenen Experimenten untersucht. Dazu wurde die Carboxylkomponente

a) ohne Zusatz des HF-Komplexes und

b) in Anwesenheit des 10-fachen Überschusses HF-Komplex

mit HAPyU (1 Äq.) in DMF in Gegenwart von 1 Äq. DIEA 60 s voraktiviert und mit einer Mischung aus Aminokomponente (1 Äq.)/ DIEA (1 Äq.) in DMF umgesetzt. Die Behandlung von **33** mit Base diente dabei der Freisetzung des TFA-Salzes der Aminofunktion. Wie

aus Abb. 29 deutlich wird, wurde nach einer Kupplungszeit von 21 h eine etwas geringere Kupplungsausbeute bei der Reaktion in Anwesenheit des HF-Komplexes festgestellt.

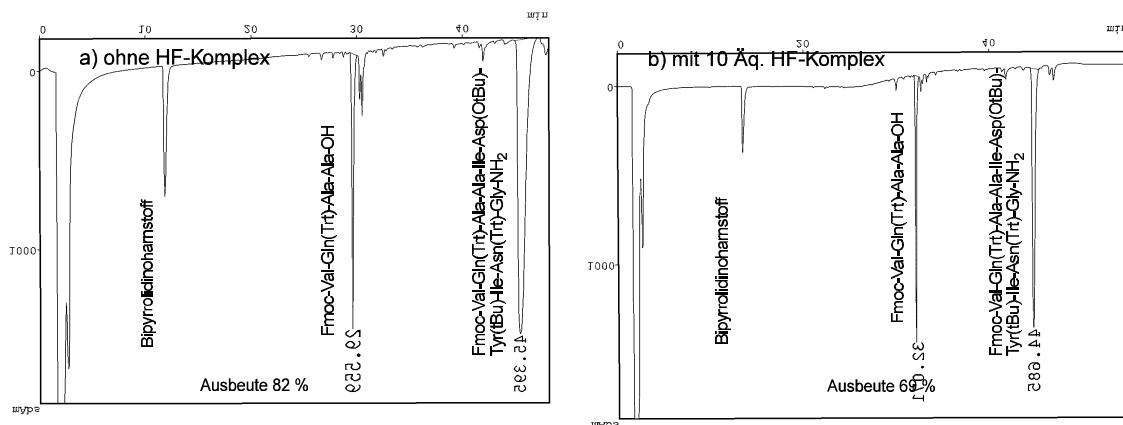


Abb. 29: HPLC-Profile der Umsätze der Reaktionen a) und b) zur Synthese von ACP(65-74) nach 21 h

Nach Schutzgruppenabspaltung und Isolierung der nach a) und b) synthetisierten Rohpeptide wurden diese mittels HPLC und ES-MS charakterisiert (Abb. 30).

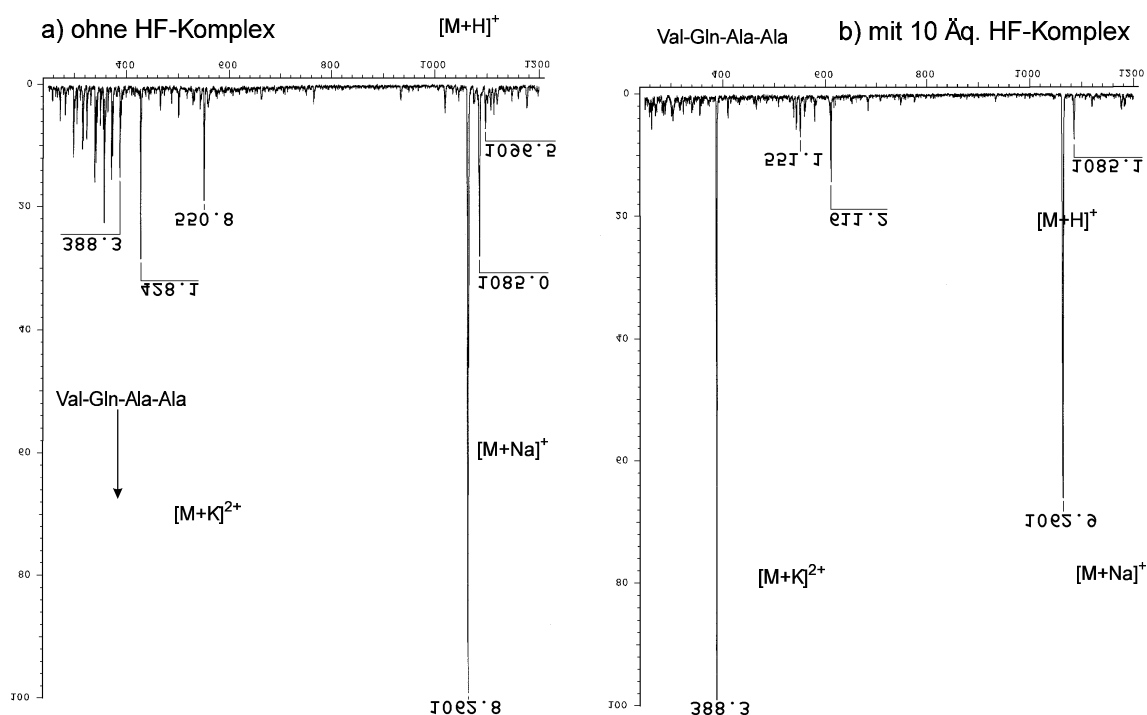


Abb. 30: Massenspektren der ungeschützten Peptide aus den Segmentkupplungsprozessen a) und b) zur Synthese von ACP(65-74)

Die GC-MS Epimerisierungsuntersuchungen erbrachten das Ergebnis, daß durch Zusatz des Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplexes der Anteil an D-Alanin von $1,6 \% \pm 0,2 \%$ auf $0,5 \% \pm 0,1 \%$ verringert wurde. Damit konnte gezeigt werden, daß sich die Modelluntersuchungen zur Verwendung des Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplexes als Methode zur Senkung der Epimerisierung auf die Synthese eines längeren Peptides übertragen ließen.

5.5. Bedeutung der Kupplung in Gegenwart des Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplexes

Anhand der Modelluntersuchungen wurde gezeigt, daß die *in situ* Bildung von Peptidsegmentfluoriden unter sauren Reaktionsbedingungen via Carbodiimid-vermittelter Oxazolonbildung und anschließender Addition von Pyridin-poly(hydrogenfluorid) im unpolaren Lösungsmittel zu erreichen ist. Die erhaltenen Peptidfluoride sind effiziente Acylierungsmittel, die hohe Umsätze mit sehr geringer Epimerisierung gewährleisten. Der Zusatz polarerer Lösungsmittel zur Verbesserung der Löslichkeit, wie DMF, zum Peptidfluorid in DCM bewirkt eine partielle Umwandlung zum Oxazolon. Dessen Aminolyse erfolgt infolge der sauren Reaktionsbedingungen ohne Verlust der chiralen Integrität. Die mit DIC/HF erhaltenen Ergebnisse waren vergleichbar zu jenen mittels Carbodiimid/HOBt oder HOAt-Aktivierung.

Der bemerkenswerte Vorteil des Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Additivs besteht in seiner Fähigkeit, die anwesende Base abzufangen, die zur Aktivierung von Carboxylgruppen mit Uroniumsalzen notwendig ist. Im Ergebnis verliefen Kupplungen unter Verwendung der Kombinationen von (i) HAPyU/ 1 Äq. DIEA/ 10 Äq. HF-Komplex und (ii) HAPyU/ 1 Äq. Collidin/ 5 oder 10 Äq. HF-Komplex unter nahezu vollständiger Vermeidung der Stereomutation. Dabei zeigte sich in DMF eine ausreichende Stabilität säurelabiler Seitenkettenschutzgruppen.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung neuer sowie eine Optimierung bestehender Kupplungsmethoden mit dem Ziel einer epimerisierungsarmen Peptidsegmentkondensation durchgeführt. Ausgehend von der hier beobachteten beträchtlichen Epimerisierung bei der Kupplung von Peptidsegmenten mit bekannten Uroniumsalzen und neu entwickelten, modifizierten Aktivierungsreagenzien wurde zunächst der Mechanismus der Aktivierung geschützter Peptidsegmente untersucht.

Wesentliche Ergebnisse sind:

I. Die mechanistischen Untersuchungen

- Die bisher als erster Schritt der Aktivierung mit Uroniumsalzen angenommene O-Acyluroniumverbindung konnte hier erstmalig am Modell der Aktivierung der sterisch gehinderten Mesitylencarbonsäure mit HAPyU mittels ^{13}C -NMR-Tieftemperatur-Untersuchungen direkt nachgewiesen werden. Das O-Acyluroniumintermediat ließ sich auf unabhängigem Weg aus der Reaktion von Mesitylencarbonsäurechlorid mit Bipyrrolidinoharnstoff und SbCl_5 darstellen. Die höhere Reaktivität des O-Acyluroniumintermediates im Vergleich zum Mesitylencarbonsäure-OAt-Ester wurde durch Aminolyse mit Benzylamin in DCM nachgewiesen. Die geringe Lebensdauer des Intermediates ist vermutlich die Ursache dafür, daß es im Verlauf der Aktivierung von Peptiden bisher nicht nachweisbar war. Es reagiert sehr schnell zu aktivierten Spezies, wie Aktivester und Oxazolon.
- Der Verlust der chiralen Integrität am aktivierten Carboxylrest im Verlauf der Peptidsegmentkondensation mit Uroniumsalzen wird durch die Bildung von Oxazolon in Gegenwart des zur Aktivierung notwendigen tertiären Amins verursacht. Während der Aktivierung geschützter Peptidsegmente kommt es zur Ausbildung eines Gleichgewichtes zwischen Aktivester und Oxazolon. Die Lage dieses Gleichgewichtes wird durch die Lösungsmittelpolarität, durch die Addition von Base oder N-Hydroxyverbindungen beeinflusst. In Gegenwart von 2 Äq. des tertiären Amins zur Aktivierung steigt der Oxazolongehalt im Gleichgewicht in Abhängigkeit von der Natur der Abgangsgruppe im Uroniumsalz in der Reihenfolge $\text{HONB} \ll \text{HOBt} < \text{HOAt}$. Durch den Zusatz einer Base verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten des Oxazolons. Bezüglich der Stereomutation solcher Kupplungen wurde ein Anteil des LDL-Isomers in entgegengesetzter Ordnung zur Menge an Oxazolon gefunden. Für diese unerwartete

Reihenfolge sind die Geschwindigkeit der Oxazoloningöffnung durch N-Hydroxyverbindungen, die Reaktivität des Aktivesters und der Anteil an freier N-Hydroxyverbindung zur Neutralisation der benötigten Base verantwortlich. Daraus folgt, daß eine effiziente Pufferung jeglicher Base im System durch ein geeignetes saures Additiv zur Verringerung der Stereomutation essentiell ist. Dabei muß die Säurestärke des Additivs für die Pufferung des für die Aktivierung notwendigen tertiären Amins ausreichend sein. Andererseits darf das saure Additiv nicht die Aktivierung und Kupplung infolge einer vollständigen Protonierung des tertiären Amins oder der Aminokomponente verhindern.

II. Schlußfolgerungen aus den mechanistischen Untersuchungen

Prinzipiell kann die Epimerisierung während der Peptidsegmentkondensation auf drei unterschiedlichen Wegen unterdrückt werden:

- Abpuffern von Base (sowohl des tertiären Amins als auch der Aminokomponente):

Im Fall einer baseninitiierten Aktivierung, wie bei Anwendung der Uroniumsalze, muß die anwesende Base durch ein geeignetes saures Additiv abgepuffert werden. Außerdem sind schnelle Aminolyse des Aktivesters und dessen schnelle Bildung durch Ringöffnung des Oxazolons notwendig.

- Ausschluß von Base:

Die Aktivierung mit Bildung von Oxazolon wird unter sauren Reaktionsbedingungen mittels Carbodiimid im unpolaren Lösungsmittel durchgeführt. Durch Zusatz eines Additivs läßt sich das Oxazolon unter Erhaltung der Konfiguration in eine aktivere Spezies, z.B. Aktivester, Peptidfluorid, überführen.

- Vermeidung von Oxazolon:

Die Aktivierung erfolgt über das Mischanhydrid bei effektiver Neutralisation der Base. Dieses wird in den Aktivester überführt. Die anschließende Kupplung erfolgt ohne Zusatz von Base oder mit einem epimerisierungsfreien Aktivester (ONB, ONSu).

III. Methoden für die Peptidsegmentkondensation

Aufgrund der Komplexität der Einflüsse bei der Kupplung von Peptidsegmenten kann nicht eine einzelne Methode als universelle Lösung vorgeschlagen werden. Vielmehr dient das Verständnis der Zusammenhänge als Grundlage für eine angepaßte Lösung für das jeweilige Kupplungsproblem.

- Pyridin-poly(hydrogenfluorid) erwies sich als sehr gut geeignetes saures Additiv im Verlauf von Uroniumsalzkupplungen im polaren Lösungsmittel, da hohe Kupplungsaus-

beuten und geringe Epimerisierung damit erhalten wurden. Selbst unter den gewählten Modellkupplungsbedingungen, bei denen Epimerisierung provoziert wurde, konnte bei Verwendung der Kombinationen (i) HAPyU/ 1 Äq. DIEA/ 10 Äq. HF-Pyridin und (ii) HAPyU/ 1 Äq. Collidin/ 5 oder 10 Äq. HF-Pyridin eine epimerisierungsarme Segmentkondensation erreicht werden. Die Gefahr der Abspaltung säurelabiler Seitenskettenschutzgruppen bei Anwendung des HF-Additivs in DMF ist vernachlässigbar gering.

- Eine alternative Variante wurde mit der Kupplung von Peptidsäurefluoriden gefunden, die unter sauren Reaktionsbedingungen mittels DIC/HF-Pyridin in unpolaren Lösungsmitteln synthetisiert wurden. Die Kupplung kann ohne signifikante Epimerisierung auch in polareren Lösungsmittelsystemen erfolgen. Diese neue Methode lieferte vergleichbar gute Ergebnisse wie im Fall von DIC/HOBt oder HOAt-Kupplungen unter Verwendung einfacher und preiswerter Reagenzien anstelle komplexer und kostenaufwendiger organischer Additive.
- Eine weitere Möglichkeit zur Unterdrückung der Epimerisierung besteht in der Vermeidung der Oxazolonbildung während der Aktivierung. Mischanhydride sind weniger reaktiv hinsichtlich der Umwandlung zum Oxazolon als die O-Acyluronium-intermediate während der Uroniumsalzaktivierung. Bei der Aktivierung mittels Chlorameisensäureester führt zusätzlich die freigesetzte HCl zur Unterdrückung der basenkatalysierten Stereomutation. Ausgehend davon wurde eine verbesserte Methode mit der Herstellung von Aktivestern, wie ONB- und OBt-Ester, via Mischanhydridmethode unter Verwendung von Chlorameisensäureisobutylester/HONB oder des neu entwickelten Chlorocarbonyloxybenzotriazols gefunden. Diese Ester können in unpolaren Lösungsmitteln mit sehr geringer Stereomutation gekuppelt werden.

7. Experimenteller Teil

7.1. Chemikalien

Z-Gly-Ala-OH, H-Val-OBn-HCl und H-Leu-pNA wurden von der Firma Bachem Inc. bezogen. DIEA, NMM, Collidin, Piperidin, Cyanurfluorid und DAST wurden von der Firma Fluka gekauft und wie alle hier nicht explizit erwähnten Reagenzien ohne weitere Reinigung eingesetzt. Benzylamin von Fluka wurde über Molekularsieb (3 Å) aufbewahrt. Des weiteren wurde DCC der Firma Riedel DE HAËN AG sowie DIC und HOBt ebenfalls von Fluka verwendet. Das HOAt wurde von Millipore bezogen. HONB und HONSu von Ferak Berlin wurden vor der Verwendung aus Isopropanol umkristallisiert. TBTU, TBPYU, TBPipU und TOPPipU wurden nach Methoden von KNORR et al. [20] bzw. HENKLEIN et al. [51] synthetisiert. HAPyU wurde entsprechend der Methode von CARPINO und EL-FAHAM [22] synthetisiert. TNTU, o-Cl-Trt-Harz und Sieber-Amidharz wurden von Novabiochem bezogen. ClCOONB wurde nach der von HENKLEIN [95] beschriebenen Prozedur hergestellt. DMF und Acetonitril (aufbewahrt über Molekularsieb 3 Å) wurden von Baker sowie THF, Essigester, THF und der Chlorameisensäureisobutylester von Merck erhalten. DCM der Firma Baker wurde vor Gebrauch über P₄O₁₀ und anschließend über Na₂CO₃ destilliert und dann über Molekularsieb (3 Å) aufbewahrt. Die deuterierten Lösungsmittel (CD₂Cl₂, DMF-d₇, CDCl₃, CD₃CN), Bipyrrolidinoharnstoff, Bipiperidinoharnstoff, Mesitylencarbonsäure, Oxalylchlorid, BSA, SbCl₅, HPF₆ und der Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplex wurden von der Firma Aldrich bezogen. Bipyrrolidinochloroformamidiniumhexachloroantimonat wurde von Prof. L. A. Carpino, University of Massachusetts, USA, zur Verfügung gestellt.

7.2. Analytische Methoden

Die FTIR-Untersuchungen wurden an einem Nicolet Impact 400 Instrument durchgeführt. Kinetische Messungen wurden generell aus der Reaktionslösung unter Verwendung einer NaCl-Küvette vorgenommen. Feste Stoffe bzw. während der Reaktion kristallisierte Verbindungen wurden als KBr-Preßling vermessen.

Für die Durchführung der ¹H- und ¹³C-NMR-Experimente stand ein Varian Gemini 200 Gerät zur Verfügung. Das TOCSY-¹H-NMR-Experiment wurde an einem Bruker 600 Spektrometer durchgeführt. Für die Tieftemperatur-¹³C-NMR-Untersuchungen kam ein Bruker 300 Gerät zur Anwendung. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm relativ zu

Tetramethylsilan angegeben. Als interne Referenz wurden folgende Lösungsmittelsignale verwendet: für ^1H -NMR DMF- d_7 : 2,91 ppm (CH_3), CD_2Cl_2 : 5,31 ppm (CH_2), CDCl_3 : 7,26 ppm (CH); für ^{13}C -NMR DMF- d_7 : 162,5 ppm (CHO), CD_2Cl_2 : 53,7 ppm (CH_2), CDCl_3 : 77,7 ppm (CH). Zur Kennzeichnung der Multiplizität der ^1H -Signale wurden die folgenden Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), quart (Quartett), quin (Quintett), hept (Heptett), dd (Dublett vom Dublett), m (Multiplett). Kinetische ^1H -NMR-Messungen zum Aktivester/Oxazolon-Gleichgewicht wurden nach folgendem Zeitplan durchgeführt: 0,5, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 min und 16 h. Dabei wurde für die Identifizierung von eingesetztem Dipeptid, Oxazolon und Aktivester in der Reaktionsmischung die charakteristische Tieffeldverschiebung des CH_2 -Dupletts von Glycin herangezogen (siehe Tab. 17 Anhang). Durch Summierung der Integrale der CH_2 -Singulett der Z-Schutzgruppen als Referenz wurde der Anteil der verschiedenen Komponenten im Reaktionsgemisch quantifiziert. Die Bestimmung der Halbwertszeit der Mesitylen-carbonsäure-Aktivderivate erfolgte mittels ^1H -NMR aus dem Integral der CH_2 -Signale von Ausgangsstoff (Benzylamin) und Reaktionsprodukt (N(2,4,6-Trimethylbenzoyl)-benzylamid). Es wurde die Zeit ermittelt, in der die Konzentration von Benzylamin auf 50 % gesunken war (Summe von Ausgangsstoff und Reaktionsprodukt entspricht 100 %).

Die HPLC-Untersuchungen erfolgten, wenn nicht explizit erwähnt, unter Verwendung einer Vydac C 18 4×200 mm Säule des Typs 218 TPS415 an einem Merck-Hitachi Instrument mit einem L4250 UV-VIS Detektor bei 220 nm, D6000 Interface, LC Organizer, Pumpe A L6200, Pumpe B L6000 sowie unter Einsatz eines AS4000 Autosamplers. Die Bedingungen für die Epimerisierungsuntersuchungen waren: Flußrate 1 ml/min, mobile Phase: Laufmittel A H_2O : TFA = 1000:1, Laufmittel B H_2O : CH_3CN : TFA = 200:800:1.

Die Epimerisierungsuntersuchungen mit Hilfe der GC-MS-Technik wurden an einem GC-Quadrupol-MS Gerät (Fisons Trio 1000) unter Verwendung einer chiralen Chirasil-Val-Säule (30m, 0,32 mm i.d., Machery Nagel) durchgeführt. Die Hydrolyse der geschützten Tripeptide erfolgte in 6 N DCl/ D_2O für 24 h bei 110°C. Danach wurden die Aminosäuren in die entsprechenden N-Trifluoracetylisopropylester überführt. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte im „Selective-Ion-Mode“ (SIM).

Für die ES-MS-Untersuchungen der Modellpeptide und Kondensationsreagenzien kam ein TSQ 700, Finnigan MAT 95 Gerät zur Anwendung (Spritzeninfusion 2 $\mu\text{l/min}$ Acetonitril, Acetonitril/Wasser/Essigsäure oder Methanol/Wasser).

Für die dünnschichtchromatographische Verfolgung von Reaktionen wurde mit Kieselgel beschichtetes Glas der Firma Merck verwendet.

Die Elementaranalysen wurden an einem LECO CHNS 932 Gerät durchgeführt.

Zur Bestimmung der Schmelzpunkte kam ein Heiztisch Rapido VEB Wägetechnik PHMK zur Anwendung (Schmelzpunkte sind nicht korrigiert).

7.3. Synthese von Kondensationsreagenzien

Fluoroformamidiniumsalze (Kapitel 2.2.)

0,1 mol N,N-disubstituierter Harnstoff wurden in 50 ml trockenem DCM vorgelegt und langsam unter Rühren 0,095 mol Oxalylchlorid bei Raumtemperatur addiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 2-3 h unter Rückfluß bei 40°C gehalten. Nach Zusatz von 150 ml trockenem Diethylether wurde das ausgefallene kristalline Produkt abgetrennt, nochmals mit Diethylether gewaschen und kurz im Vakuum getrocknet [20].

Aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften der so erhaltenen N,N-disubstituierten Chloroformamidiniumchloride erfolgte sofort die Reaktion zu den N,N-disubstituierten Chloroformamidiniumhexafluorophosphaten [20,50,79,80,110] durch Umsetzung von 0,075 mol der Chlorosalze in 100 ml trockenem Acetonitril mit 0,075 mol KPF₆ bei Raumtemperatur. Nach ca. 15 h wurde das entstandene KCl abfiltriert, das Filtrat am Vakuumrotationsverdampfer bis zur Hälfte eingeeengt und die Produkte mit Diethylether gefällt, filtriert, gewaschen und über P₄O₁₀ im Vakuum getrocknet.

Die Umsetzung zu den Fluoroformamidiniumsalzen erfolgte nach der auch von CARPINO angegebenen Methode [77]. 0,02 mol der Chloroformamidiniumhexafluorophosphate wurden in 30 ml trockenem Acetonitril gelöst und 0,02 mol KF (bei 130°C vorgetrocknet) bei Raumtemperatur portionsweise unter Rühren addiert. Nach 15 h wurde das KCl abgetrennt und die verbliebene Lösung bis auf wenige Milliliter eingeeengt. Durch Zutropfen von Diethylether wurden die N,N-disubstituierten Fluoroformamidiniumhexafluorophosphate gefällt, danach filtriert, mit Diethylether gewaschen und aus Acetonitril/Diethylether umkristallisiert.

Bipyrrolidinochloroformamidiniumhexafluorophosphat

C₉H₁₆N₂ClF₆P (332,7)

¹H-NMR (ppm, CDCl₃): 2,0 (m, 8, 4CH₂); 3,82 (m, 8, 4CH₂N)

¹³C-NMR (ppm, CDCl₃): 25,1 (4CH₂); 54,3 (4CH₂N); 151,8 (C⁺-Cl)

Bipyrrolidinofluoroformamidiniumhexafluorophosphat (Abb. 6, 6b)

C₉H₁₆N₂F₇P (316,2)

weiße Kristalle Ausbeute: 90 % Fp.: 124-127°C

¹H-NMR (ppm, CDCl₃): 2,0 (m, 8, 4CH₂); 3,83 (m, 8, 4CH₂N)

¹³C-NMR (ppm, CDCl₃): 23,6+25,7 (4CH₂); 49,0+50,2 (4CH₂N); 150,0+153,6 (C⁺-F);

Verunreinigung (Pyr)2C⁺-Cl

ES-MS (pos. Mode): ber.: 171,2 [M]⁺; gef.: 171,1 [M]⁺; Verunreinigung (Pyr)2C⁺-Cl: ber.: 187,7 [M]⁺; gef.: 187,0 [M]⁺

Bipiperidinochloroformamidiniumhexafluorophosphat

C₁₁H₂₀N₂ClF₆P (360,7)

¹H-NMR (ppm, CDCl₃): 1,68 (m, 4, 2CH₂); 1,74 (m, 8, 4CH₂); 3,69 (m, 8, 4CH₂N)

¹³C-NMR (ppm, CDCl₃): 22,7 (2CH₂); 25,5 (4CH₂); 54,2 (4CH₂N); 155,8 (C⁺-Cl)

Bipiperidinofluoroformamidiniumhexafluorophosphat

C₁₁H₂₀N₂F₇P (344,3)

weiße Nadeln Ausbeute: 80 % Fp.: 138-140°C

¹H-NMR (ppm, CDCl₃): 1,68 (m, 4, 2CH₂); 1,76 (m, 8, 4CH₂); 3,56 (m, 8, 4CH₂N); Rest (Pip)2C⁺-Cl: 3,5 %

¹³C-NMR (ppm, CDCl₃): 22,6 (2CH₂); 24,8 (4CH₂); 49,4 (4CH₂N); 152,0+155,7 (C⁺-F)

ES-MS (pos. Mode): ber.: 199,3 [M]⁺; gef.: 198,9 [M]⁺; geringe Verunreinigung (Pip)2C⁺-Cl: ber.: 215,7 [M]⁺; gef.: 214,9 [M]⁺

1,3-Dimethyl-2-chloroimidazolidiniumhexafluorophosphat

C₅H₁₀N₂ClF₆P (278,6)

ES-MS (pos. Mode): ber.: 133,6 [M]⁺; gef.: 133,0 [M]⁺

1,3-Dimethyl-2-fluoroimidazolidiniumhexafluorophosphat

C₅H₁₀N₂F₇P (262,1)

weiße Kristalle Ausbeute: 92 % Fp.: 148-150°C

¹H-NMR (ppm, CD₃CN): 2,0 (6, 2CH₃); 3,76 (t, 4, 2CH₂)

¹³C-NMR (ppm, CD₃CN): 25,1 (2CH₃); 55,4 (2CH₂); 151,2 (C⁺-F)

ES-MS (pos. Mode): ber.: 117,1 [M]⁺; gef.: 117,0 [M]⁺

1-(1-Pyrrolidinyl-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylmethylen)pyrrolidinium-hexachloroantimonat-N-Oxid (Kapitel 3.1.1., Abb. 12, 19b)

C₁₄H₁₉ON₆Cl₆Sb (621,8)

Die Synthese wurde in Analogie zur HAPyU-Herstellung durchgeführt [22]. 5 mmol Bipyrrolidinochloroformamidiniumhexachloroantimonat wurden in 40 ml Acetonitril vorgelegt und bei 15°C unter Stickstoffatmosphäre 4,55 mmol KOAt portionsweise addiert. Die Reaktionsmischung wurde 42 h bei Raumtemperatur gerührt, das entstandene KCl abgetrennt und die Lösung am Rotationsverdampfer bis zur beginnenden Kristallisation eingengt. Nach Lagerung bei -18°C über Nacht wurde das Kristallisat abfiltriert und aus Acetonitril/Ethanol umkristallisiert.

gelbweiße Nadeln Ausbeute: 78 % Fp.: 162-164°C

¹H-NMR (ppm, DMF-d₇): 1,9-2,4 (m, 8, 4CH₂); 3,5-4,3 (m, 8, 4CH₂N); 8,08 (dd, 1, CH); 8,59 (d, 1, CH); 8,91 (d, 1, CH)

¹³C-NMR (ppm, DMF-d₇): 25,0+26,6 (4CH₂); 52,3+53,6 (4CH₂N); 124,8; 128,5; 149,8 (3xCH); 127,4; 143,4 (2xCq); 145,8 (C⁺)

ES-MS (pos. Mode (Py)₂C⁺-OAt): ber.: 287,3 [M]⁺; gef.: 287,3 [M]⁺; (neg. Mode) ber.: 334,5 [SbCl₆⁻]; 263,6 [SbCl₄⁻]; 228,1 [SbCl₃⁻]; gef.: 334,8; 262,9; 226,9

Bipyrrolidinochloroformamidiniumhexachloroantimonat

C₉H₁₆N₂Cl₇Sb (522,2)

¹H-NMR (ppm, CD₂Cl₂/CD₃CN 7:1): 2,06 (m, 8, 4CH₂); 3,83 (m, 8, 4CH₂N)

¹³C-NMR (ppm, CD₂Cl₂/CD₃CN 7:1): 25,5 (4CH₂); 55,2 (4CH₂N); 152,5 (C⁺-Cl)

7.4. Synthese von Mesitylencarbonsäurederivaten

Die ^{13}C -NMR-Daten zur Charakterisierung der Mesitylencarbonsäurederivate sind in den Tab. 12 - Tab. 15 im Anhang enthalten.

Mesitylencarbonsäurechlorid [82] (Kapitel 3.1.1.)

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{OCl}$ (182,6)

2,4,6-Trimethylbenzoesäure (0,122 mol) und Thionylchlorid (0,244 mol) wurden unter Stickstoffatmosphäre 5 h unter Rückfluß gekocht. Die Destillation der Reaktionsmischung unter N_2 im Ölpumpenvakuum lieferte eine farblose Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 71°C (1 mbar) ([82]: 87°C (2 mm Hg)).

Ausbeute: 62 %

IR (NaCl-Küvette, 0,4 M DCM-Lösung): $1789,8\text{ cm}^{-1}$ (COCl)

^1H -NMR (ppm, CDCl_3): 2,31 (s, 3, CH_3); 2,4 (s, 6, 2CH_3); 6,9 (s, 2, 2CH_{arom})

Bipyrrolidino[(mesitylcarbonyl)oxy]uroniumhexachloroantimonat (Kapitel 3.1.1., Abb. 9)

$\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{O}_2\text{N}_2\text{Cl}_6\text{Sb}$ (649,9)

Die Synthese erfolgte in modifizierter Weise nach TEICHMANN [83]. Zu einer Lösung aus 2,4,6-Trimethylbenzoylchlorid (10 mmol) und Bipyrrolidinoharnstoff (10 mmol) in trockenem DCM (20 ml) wurden bei -20°C unter N_2 tropfenweise 10 ml einer 1 M Lösung von SbCl_5 (10 mmol) in wasserfreiem DCM addiert (in einem Zeitraum von 15 min). Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei Raumtemperatur unter N_2 gerührt und danach bis etwa zur Hälfte im Vakuum eingeeengt. Nach Abkühlung auf -18°C bildete sich ein Kristallisat, das abfiltriert, mit trockenem Diethylether gewaschen (3x) und im Vakuum getrocknet wurde.

gelbe Nadeln Ausbeute: 30 % Fp.: $83\text{--}85^\circ\text{C}$

IR (KBr): 1773 cm^{-1} ($\text{O}=\text{COC}^+$); 1659 cm^{-1} ($\text{C}=\text{N}^+$); 1608 cm^{-1} ; 1452 cm^{-1}

^1H -NMR (ppm, CD_2Cl_2): 1,91-2,2 (m, 8, 4CH_2); 2,32 (s, 3, CH_3); 2,52 (s, 6, 2CH_3); 3,52-3,85 (m, 8, $4\text{CH}_2\text{N}$); 7,03 (s, 2, 2CH_{arom}); 20 % Verunreinigung durch Mesitylencarbonsäure berechnet durch Vergleich mit $\delta=6,89$ (s, 2, 2CH_{arom}) (Kapitel 3.1.1., Abb. 10)

Mesitylencarbonsäure: ^1H -NMR (ppm, CDCl_3): 2,30 (s, 3, CH_3); 2,42 (s, 6, 2CH_3); 6,89 (s, 2, 2CH_{arom})

Mesitylencarbonsäure-OAt-Ester (Kapitel 3.1., Abb. 8, 18)

$C_{15}H_{14}O_2N_4$ (282,3)

HOAt (2,5 mmol) wurde mit DIEA (2,5 mmol) in 13 ml trockenem DCM gelöst und anschließend bei Raumtemperatur Mesitylencarbonsäurechlorid (2,75 mmol) unter N_2 zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 3 h gerührt und mittels DC unter Verwendung von Essigester/ n-Hexan (6:4) verfolgt. Nach Addition von 13 ml DCM wurde die Reaktionslösung nacheinander je zweimal mit jeweils 15 ml 10 % $KHSO_4$ -, 10 % $NaHCO_3$ - und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, im Vakuum eingengt und das Rohprodukt aus DCM/ n-Hexan umkristallisiert.

weiße Kristalle Ausbeute: 81 % Fp.: 162-163°C

IR (KBr): 1797,6 cm^{-1} ; 1785,9 cm^{-1} (C=O); 1609,1 cm^{-1}

1H -NMR (ppm, CD_2Cl_2): 2,36 (s, 3, CH_3); 2,61 (s, 6, $2CH_3$); 7,04 (s, 2, $2CH_{arom}$); 7,47 (dd, 1, $CHOat$); 8,46 (d, 1, $CHOat$); 8,76 (d, 1, $CHOat$)

Elementaranalyse für $C_{15}H_{14}O_2N_4$:

ber.: C: 63,83 %; H: 4,96 %; O: 11,35 %; N: 19,86 %

gef.: C: 63,92 %; H: 4,91 %; O: 11,03 %; N: 19,09 %

HPLC-Bedingungen: Shimadzu HPLC System; SPD10AV UV-VIS Detektor $\lambda=220$ nm, LC8A Pumpen, SCL10A Controller; Säulentyp: Vydac 218 TP10415 4×200 mm; Flußrate 2,0 ml/min; isokratisch; mobile Phase: A H_2O : TFA = 1000:2, B H_2O : CH_3CN : TFA = 100:500:1; Mesitylencarbonsäure-OAt-Ester gelöst in DCM, DMF oder hergestellt mit HAPyU in Gegenwart von Collidin tR: 30 min; tR (Mesitylencarbonsäure): 2,9 min; tR (Bipyrrolidinoharnstoff): 1,2 min

N(2,4,6-Trimethylbenzoyl)benzylamid [111] (Kapitel 3.1.2., Abb. 14, 20)

$C_{17}H_{19}ON$ (253,3)

5 mmol Benzylamin und 5 mmol Triethylamin wurden in 30 ml trockenem DCM vorgelegt und 5,5 mmol Mesitylencarbonsäurechlorid tropfenweise bei Raumtemperatur unter Rühren addiert. Nach 3 h wurde die Reaktionslösung auf 100 ml mit DCM verdünnt und nacheinander mit 1 N HCl, 1 M $NaHCO_3$ - und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde über $MgSO_4$ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt aus CH_2Cl_2 / n-Hexan umkristallisiert.

weiße Kristalle Ausbeute: 89 % Fp.: 137-139°C

IR (KBr): 1630,4 cm^{-1} (CONH)

$^1\text{H-NMR}$ (ppm, CD_2Cl_2): 2,2 (s, 6, 2CH_3); 2,29 (s, 3, CH_3); 4,5 (d, 2, CH_2); 6,8 (s, 2, 2CH_{arom}); 7,23-7,4 (m, 5, $5\text{xCH}_{\text{phenyl}}$)

Benzylamin: $^1\text{H-NMR}$ (ppm, CD_2Cl_2): 1,35 (s, 2, NH_2); 3,85 (s, 2, CH_2), 7,28-7,39 (m, 5, $5\text{xCH}_{\text{phenyl}}$)

Collidiniumhexafluorophosphatsalz als Referenz für die $^{13}\text{C-NMR}$ Untersuchungen (Anhang Tab. 13 -Tab. 15)

$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{NF}_6\text{P}$ (267,2)

3 mmol Collidin wurden in 3 ml THF gelöst und 3 mmol (442,2 μl) HPF_6 (60 % in H_2O) addiert. Dabei erwärmte sich das Reaktionsgemisch. Es wurde 5 min gerührt, Molsieb (4 Å) zugegeben und mit weiteren 12 ml THF verdünnt. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min stehen gelassen, das Molsieb abfiltriert und das Lösungsmittel am Vakuumrotationsverdampfer abgetrennt. Danach wurde 1 ml Benzol zugegeben, wiederum im Vakuum eingengt und dieser Prozeß 5x wiederholt. Der entstandene Feststoff wurde mit Diethylether gewaschen, abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

weißer Feststoff Ausbeute: 77 % Fp.: 125°C

Elementaranalyse für $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{NF}_6\text{P}$:

ber.: C: 35,96 %; H: 4,49 %; N: 5,24 %

gef.: C: 34,66 %; H: 4,22 %; N: 5,12 %

$^1\text{H-NMR}$ (ppm, CD_2Cl_2): 2,55 (s, 3, CH_3); 2,72 (s, 6, 2CH_3); 7,36 (s, 2, 2CH_{arom})

Collidin: $^1\text{H-NMR}$ (ppm, CD_2Cl_2): 2,23 (s, 3, CH_3); 2,41 (s, 6, 2CH_3), 6,78 (s, 2, 2CH_{arom})

7.5. Kinetische Untersuchungen an Mesitylencarbonsäurederivaten

Reaktion von Mesitylencarbonsäurechlorid mit Bipyrrolidinoharnstoff und SbCl_5 (Kapitel 3.1.1.)

0,24 mmol Mesitylencarbonsäurechlorid und 0,24 mmol Bipyrrolidinoharnstoff wurden in 600 μl CD_2Cl_2 in einem NMR-Röhrchen vorgelegt. Die Lösung wurde auf unter -50°C gekühlt und unmittelbar nach Addition von 0,24 mmol (30,41 μl) SbCl_5 mit der $^{13}\text{C-NMR}$ -Tieftemperatur-Messung begonnen (Temperatur im Spektrometer -50°C). Nach Aufnahme des 1. Spektrums wurde die Temperatur im Spektrometer langsam erhöht, wobei

Messungen bei -5°C und 20°C durchgeführt wurden (¹³C-NMR-Daten Tab. 12 siehe Anhang).

Aktivierung von Mesitylencarbonsäure mit HAPyU in Gegenwart von Collidin (Kapitel 3.1.1.)

0,24 mmol Mesitylencarbonsäure wurden zusammen mit 0,24 mmol HAPyU bzw. des SbCl₆-Analogons von HAPyU (Abb. 12, **19b**) in einem NMR-Röhrchen in 600 µl CD₂Cl₂ suspendiert und auf unter -50°C gekühlt. Unmittelbar nach der Addition von 0,24 mmol Collidin wurde das ¹³C-NMR-Spektrum bei -50°C aufgenommen. Die Temperatur im Spektrometer wurde erhöht und Messungen bei -5°C und 20°C durchgeführt. Die in den Tab. 13-Tab. 14 (siehe Anhang) aufgeführten Substanzen wurden zum Vergleich bei den angegebenen Temperaturen gemessen.

Die analoge Aktivierung wurde zuvor bei Raumtemperatur mittels IR und ¹³C-NMR untersucht, wobei Messungen 2,5; 10; 20; 40; 60 und 120 min nach der Addition von Collidin durchgeführt wurden (¹³C-NMR-Daten Tab. 15 siehe Anhang).

Reaktivitätsuntersuchungen zu Mesitylencarbonsäureaktivderivaten mittels ¹H-NMR (Tab. 2, Kapitel 3.1.2.)

0,28 mmol isoliertes Bipyrrolidino[(mesitylcarbonyl)oxy]uroniumhexachloroantimonat bzw. Mesitylencarbonsäure-OAt-Ester (synthetisiert wie in Kapitel 7.4. beschrieben) wurden in 700 µl CD₂Cl₂ gelöst und in ein NMR-Röhrchen überführt. Sofort nach Zugabe von 0,28 mmol Benzylamin und 0,28 mmol DIEA bei RT wurde mit den ¹H-NMR-Kinetik-Messungen (im Abstand von 20 s) begonnen (Bestimmung der Reaktivitäten siehe Kapitel 7.2.).

7.6. Kinetische Untersuchungen zur Aktivierung von Peptidsegmenten

Aktivierung von Z-Gly-Ala-OH mit Fluoroformamidiniumsalzen (Kapitel 2.2.)

Z-Gly-Ala-OH (0,1 mmol) wurde zusammen mit Bipyrrolidinofluoroformamidiniumhexafluorophosphat (0,1 mmol) in 1 ml DCM suspendiert und nach Addition von DIEA (0,2 mmol) bei RT wurden IR-Messungen im Zeitraum von 2 bis 240 min durchgeführt.

Aktivierung von Z-Gly-Ala-OH mit Uroniumsalzen (Kapitel 3.2.1., 3.2.2.)

DIEA (0,2 mmol) wurde zu einer Mischung aus Z-Gly-Ala-OH (0,1 mmol) und Aktivierungsreagenz (0,1 mmol) in 1 ml DCM bei RT zugefügt. Anschließend wurden IR-Messungen unter Verwendung von TBTU, TBPYU, HAPYU und TNTU wiederholt im Zeitraum von 2 bis 180 min durchgeführt. Die Aktivierung mit TBTU wurde in Gegenwart von weniger DIEA (0,1 mmol) bzw. unter zusätzlicher Addition von 1 Äq. HOBt wiederholt. Dazu wurden 3 Messungen innerhalb einer Periode von 30 min aufgenommen.

¹H-NMR-Studien bei RT im polaren Reaktionsmedium mit TBTU, TBPYU, HAPYU und TNTU wurden in einer 0,23 M DMF-d₇-Lösung entsprechend dem in Kapitel 7.2. genannten Zeitprogramm durchgeführt. Aus den Integralintensitäten der aktivierten Spezies der ersten beiden Messungen (0,5; 5 min) konnte die Information über die Geschwindigkeit der Aktivierung erhalten werden (siehe Tab. 3). IR, ¹H-NMR und ¹³C-NMR-Daten der Intermediate bzw. Referenzsubstanzen sind in den Tab. 16 -Tab. 18 bzw. Tab. 19 (siehe Anhang) zusammengefaßt.

Reaktion von Z-Gly-Ala-Oxazolone mit N-Hydroxyverbindungen (Kapitel 3.2.3.)

Z-Gly-Ala-OH (0,1 mmol) wurde für 10 min in 1 ml DCM bei RT mit DCC (0,11 mmol) unter Bildung des Oxazolons behandelt. Nach Filtration des DCU wurde die N-Hydroxyverbindung (HOAt, HOBt oder HONB) (0,1 mmol) addiert. Vier IR-Messungen wurden innerhalb von 60 min durchgeführt. Im Fall von HOBt und HOAt bildete sich ein Niederschlag der unlöslichen Aktivester, während im Fall von HONB der Ester in Lösung blieb.

Für die ¹H-NMR-Analyse wurde bei RT eine Lösung von DCC in 0,6 ml CD₂Cl₂ zum Dipeptid, suspendiert in 0,2 ml CD₂Cl₂, addiert. Nach Abtrennung des DCU wurde die Lösung mit 0,5 ml DMF-d₇ verdünnt, um ein Referenz-Oxazolone-Spektrum im polaren Medium zu erhalten. Die N-Hydroxyverbindung (0,1 mmol) wurde in 0,5 ml DMF-d₇ gelöst. Die HOBt-Lösung wurde über 3 Å Molekularsieb einige Stunden stehen gelassen, um jeglichen Überschuß H₂O zu entfernen. Die Lösung mit der N-Hydroxyverbindung wurde jeweils zur Oxazolone-Lösung hinzugefügt (Verhältnis CD₂Cl₂/DMF-d₇ = 1:1,3), und die Reaktion wurde mittels ¹H-NMR-Analyse entsprechend dem angegebenen Zeitprogramm (Kapitel 7.2.) verfolgt. Um das Aktivester/Oxazolone-Verhältnis zu ermitteln, wurden die Integralintensitäten der Messungen bis zu 60 min berechnet.

Die Reaktion des Oxazolons mit HOBt in $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{DMF-d}_7$ bei RT wurde in Zusammenhang mit einem TOCSY- $^1\text{H-NMR}$ -Experiment wiederholt, um die Gegenwart des N-Acylisomers des OBt-Esters in der Reaktionsmischung abzusichern (siehe Abb. 18 Kapitel 3.2.3.).

Reaktion des Z-Gly-Ala-Oxazolons mit N-Hydroxyverbindung/ DIEA-Mischungen (Kapitel 3.2.3.)

Das Oxazolon wurde bei RT in einer 0,1 M DCM-Lösung mit einer Mischung aus N-Hydroxyverbindung (0,1 mmol)/ DIEA (0,1 mmol) behandelt. Die IR-Messungen wurden im Zeitraum von 2 bis 180 min durchgeführt. Im Fall der HOBt/DIEA-Addition wurde der gebildete Niederschlag des OBt-Esters nach 40 min isoliert.

Um die Reaktion im polaren Lösungsmittel bei RT mittels $^1\text{H-NMR}$ zu verfolgen, wurde eine Mischung aus Additiv/DIEA in 0,5 ml DMF-d_7 zum Oxazolon, gelöst in $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{DMF-d}_7$, addiert (die HOBt/DIEA-Lösung wurde zuvor über Molekularsieb getrocknet). Das Aktivester/Oxazolon-Verhältnis wurde wiederum von den ersten 5 Spektren bestimmt.

Addition von DIEA zu den Z-Gly-Ala-Aktivestern (Kapitel 3.2.3.)

In DCM wurde dieses Experiment nur mit dem ONB-Ester durchgeführt (OBt- und OAt-Ester in DCM schwer löslich). Das Oxazolon, synthetisiert in einer 0,1 M DCM-Lösung nach der bereits beschriebenen Methode, wurde mit HONB (0,1 mmol) bei RT behandelt und anschließend ein IR-Spektrum des Startaktivesters aufgenommen. Nach der Addition von DIEA (0,1 mmol) wurden weitere IR-Messungen im Bereich von 2 bis 60 min durchgeführt.

Für die Beobachtung der analogen Reaktion bei RT in DMF mit dem OBt-Ester wurde das HOBt (0,1 mmol) zum Oxazolon in 0,8 ml DCM addiert und das Reaktionsgemisch für 10 min gerührt. Der OBt-Ester wurde abfiltriert, in 0,7 ml DMF-d_7 aufgenommen und eine $^1\text{H-NMR}$ -Analyse des Start-OBt-Esters durchgeführt. In den Fällen des OAt- und ONB-Esters wurden diese, wie oben bereits beschrieben, in $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{DMF-d}_7$ synthetisiert. Dabei wurde zur Bildung des ONB-Esters eine längere Zeit benötigt (60 min). Nach Addition von DIEA (0,1 mmol) wurden die entsprechenden $^1\text{H-NMR}$ -Kinetikanalysen durchgeführt.

Reaktion des Z-Gly-Ala-Oxazolons mit einem doppelten Überschuß HOBt/DIEA (Kapitel 3.2.3.)

Das wie oben beschrieben synthetisierte und in $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{DMF-d}_7$ gelöste Oxazolon wurde bei RT mit einer Mischung aus HOBt (0,22 mmol)/ DIEA (0,2 mmol) in DMF-d_7 (getrocknet über Molekularsieb) behandelt. Das OBt-Ester/Oxazolon-Verhältnis wurde von den ersten 5 $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bestimmt.

Addition eines Überschusses HOBt zum Z-Gly-Ala-OBt-Ester (Kapitel 3.2.3.)

Das wie oben beschrieben in CD_2Cl_2 hergestellte Oxazolon wurde bei RT unter Verwendung von 1,2 Äq. HOBt in den OBt-Ester überführt. Zu dieser Lösung wurden sukzessive weitere 0,7 Äq. HOBt addiert, die in 1 ml DMF-d_7 gelöst waren. Die Reaktionen wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ -Analyse verfolgt.

Aktivierung von Z-Gly-Ala-OH mit ClCOOiBu / N-Hydroxyverbindung (Weg 1) (Kapitel 4.1.)

Z-Gly-Ala-OH (0,5 mmol) wurde zum Mischanhydrid mit Hilfe von Chlorameisensäureisobutylester (0,5 mmol)/ NMM (0,5 mmol) bei -13°C in 2 ml THF 5 min lang aktiviert. Nach der Abtrennung des NMM-Hydrochlorids wurde eine Mischung der N-Hydroxyverbindung (HONSu oder HONB; 0,75 mmol) und NMM (0,25 mmol) in 2 ml THF addiert und anschließend die IR-Analyse im Zeitraum von 5 bis 30 min durchgeführt.

Aktivierung von Z-Gly-Ala-OH mit ClCOOBt (Weg 2) (Kapitel 4.2.)

Chlorocarbonyloxybenzotriazol (Abb. 26, 27):



Zu einer Lösung von 0,2 mol Phosgen in 100 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Toluol}$ (1:1) bei 10°C wurden 0,1 mol fein gemörstertes KOBt portionsweise innerhalb 1 h zugesetzt und das Reaktionsgemisch danach bei RT gerührt. Anschließend wurde überschüssiges Phosgen abdestilliert, der ausgefallene Feststoff filtriert und mit 60 ml Toluol gewaschen. Die verbleibende Lösung wurde im Vakuum eingengt und der Feststoff aus Diethylether/ n-Hexan umkristallisiert.

weiße Kristalle Ausbeute: 80 % Fp.: $127-128^\circ\text{C}$

ES-MS in CH_3OH für CH_3OCOOBt ($\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_3\text{N}_3$): ber.: 194,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gef.: 193,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^{13}C -NMR (ppm, CD_2Cl_2): 115,6; 116,2; 128,5; 133,5; 134,5; 143,7 (4xCH + 2xCq); 151,2 (OCOCl)

IR (KBr): 1806 cm^{-1} (OCOCl); 1754 cm^{-1}

Ohne weitere Reinigung wurde dieses Rohprodukt zur *in situ* Aktivierung verwendet:

Z-Gly-Ala-OH (0,5 mmol) wurde mit ClCOOBt (0,5 mmol) und NMM (0,5 mmol) bei -13°C in 2 ml THF zur Reaktion gebracht. IR-Messungen wurden im Bereich von 5 bis 60 min durchgeführt.

Aktivierung von Z-Gly-Ala-OH mittels Cyanurfluorid (Kapitel 5.1.)

Zu einer Mischung aus 0,1 mmol Pyridin und 0,2 mmol H_2O in 1 ml DCM wurde eine Lösung von Cyanurfluorid (0,1 mmol) in 100 μl DCM hinzugefügt mit dem Ziel, 2 der 3 Fluoratome des Cyanurfluorids zu hydrolysieren. Diese Mischung wurde bei RT zu 0,1 mmol Z-Gly-Ala-OH in 300 μl DCM addiert und die Fluoridbildung IR-spektroskopisch 60 min verfolgt.

Aktivierung von Z-Gly-Ala-OH mittels DAST (Kapitel 5.1.)

Z-Gly-Ala-OH (0,1 mmol) wurde in 1 ml DCM suspendiert und mit 0,12 bzw. 0,033 mmol DAST bei RT behandelt. Die IR-Analyse erfolgte im Zeitraum von 8-35 min.

Bildung von Z-Gly-Ala-F mittels DIC/ Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplex (Kapitel 5.1., 49)

Z-Gly-Ala-OH (0,1 mmol) in 0,6 ml DCM wurde mit DIC (0,1 mmol) unter Bildung des Oxazolons behandelt. Nach Verdünnung mit 0,4 ml Dioxan wurde der Pyridin-poly-(hydrogenfluorid)-Komplex (5 Äq., 14 μl) bei RT addiert und das Ausmaß der Dipeptidfluoridbildung IR- und ^1H -NMR-spektroskopisch im Zeitraum von 2 bis 120 min bestimmt. In einem zweiten Experiment mit dem Ziel, die Reaktion des Peptidfluorids mittels IR zu verfolgen, wurde bei RT eine Mischung aus H-Leu-pNA (0,1 mmol), BSA (0,1 mmol) in 0,4 ml DCM zum zuvor gebildeten Dipeptidfluorid addiert. Diese Reaktion wurde wiederholt, jedoch unter Addition von H-Leu-pNA/BSA in 1 ml DMF. Danach wurde die Bildung von Oxazolone nach Addition von 1 ml DMF zum zuvor gebildeten Peptidfluorid mittels IR verfolgt.

Schließlich wurde die DCC-Aktivierung (0,11 mmol) bei RT in 1 ml DMF-d_7 in Gegenwart des HF-Pyridin-Komplexes (14 oder 28 μl) mittels ^1H -NMR für 60 min verfolgt.

7.7. Modellpeptide für Epimerisierungsuntersuchungen

H-Gly-L/DAla-Leu-OH (Referenz)

$C_{11}H_{21}N_3O_4$ (259,3)

Die Synthese der Tripeptide Z-Gly-LAla-Leu-OBn und Z-Gly-DAla-Leu-OBn zur Referenz wurde nach der Methode von IZUMIYA [73] durchgeführt. Dabei wurden zu 0,3 mmol Z-Gly-LAla-OH bzw. Z-Gly-DAla-OH in 2 ml THF bei -15°C 0,3 mmol Chlorameisensäureisobutylester getropft, die Mischung 12 min bei der Temperatur belassen und anschließend nacheinander 0,3 mmol H-Leu-OBn·TosOH in 2 ml THF und 0,3 mmol NMM zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei -15°C und 15 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in Essigester gelöst, nacheinander mit 5 %iger $NaHSO_4$ -, 5 %iger $NaHCO_3$ - und 20 %iger NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, eingengt und mit Diethylether/ n-Hexan verrieben. Die erhaltenen Tripeptide wurden in 90 %iger Essigsäure katalytisch (Palladiumschwarz) für 7 h hydriert. Nach Abtrennen des Katalysators und Entfernen der Essigsäure im Vakuum wurden die Peptide mit Diethylether/ n-Hexan gefällt.

ES-MS: H-Gly-LAla-Leu-OH: ber.: 260,3 $[M+H]^+$; gef.: 260,2 $[M+H]^+$

H-Gly-DAla-Leu-OH: ber.: 260,3 $[M+H]^+$; gef.: 260,3 $[M+H]^+$

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit wurden LLL- und LDL-Isomer des Peptides, gelöst in Laufmittel A, in verschiedenen Mengenverhältnissen (Anteil LDL-Isomer 10; 5; 1; 0,8; 0,5; 0,2 %) vermischt und mittels HPLC analysiert. Der 0,2 %ige LDL-Isomeranteil konnte nachgewiesen werden.

HPLC-Gradientensystem zur Bestimmung der Epimerisierung: linearer Gradient; 0-40 % B in 40 min; tR (H-Gly-LAla-Leu-OH): 12,9 min; tR (H-Gly-DAla-Leu-OH): 17,4 min

H-Gly-L/DVal-Val-OBn

BOC-Gly-Val-OH wurde entsprechend der etwas modifizierten Methode von BENOITON synthetisiert [21]:

BOC-Gly-ONSu

$C_{11}H_{16}O_6N_2$ (272,3)

BOC-Gly-OH (0,05 mol) und HONSu (0,055 mol) wurden in 250 ml Essigester fast vollständig gelöst und die Lösung auf -10°C gekühlt. DCC (0,055 mol) wurde in 60 ml

Essigester trüb gelöst, ebenfalls auf -10°C gekühlt und portionsweise zu obiger Mischung addiert. Es wurde 30 min bei -10°C und 16 h bei RT gerührt und die Reaktion mittels DC unter Verwendung von Essigester/ n-Hexan (9:1) verfolgt. Nach der Abtrennung des DCU wurde das Lösungsmittel etwas im Vakuum abdestilliert und anschließend bei ca. 10°C restlicher Harnstoff ausgefroren. Die verbleibende Lösung wurde vollständig eingengt und der gebildete Feststoff aus Isopropanol umkristallisiert.

weiße Kristalle Ausbeute: 88 % Fp.: 163-164°C

BOC-Gly-LVal-OH/ BOC-Gly-DVal-OH

C₁₂H₂₂O₅N₂ (274,3)

L- bzw. D-Val (0,02 mol) wurden in Triton B (0,022 mol, 40 %ige methanolische Lösung) gelöst, das Methanol im Vakuum abgetrennt, der Rückstand zweimal in DMF aufgenommen und wieder eingengt, um restliches Methanol abziehen. Zur verbleibenden kristallinen Masse wurden 25 ml DMF addiert, die Mischung auf 0°C gekühlt und portionsweise BOC-Gly-ONSu (0,01 mol) hinzugefügt. Nach Addition von weiteren 10 ml DMF wurde 30 min bei 0°C und 16 h bei RT gerührt. Das DMF wurde vollständig am Vakuumrotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand in 5 %iger NaHCO₃-Lösung aufgenommen. Es wurde dreimal mit Essigester gewaschen und die wäßrige Phase anschließend mit 20 %iger NaHSO₄-Lösung auf pH=3 angesäuert. Nach der Extraktion dieser Lösung mit Essigester (3x) wurden die vereinigten Extrakte mit H₂O gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und zu einem Öl einrotiert. Nach Verreiben mit n-Hexan und Abkühlung auf -18°C bildeten sich weiße Kristalle.

Ausbeute: BOC-Gly-LVal-OH: 72 % Fp.: 107-108°C;

 BOC-Gly-DVal-OH: 55 % Fp.: 106-107°C

HPLC-Gradientensystem: linearer Gradient; 10-100 % B in 45 min;

t_R (BOC-Gly-LVal-OH): 14,0 min; t_R (BOC-Gly-DVal-OH): 14,0 min

ES-MS: BOC-Gly-LVal-OH: ber.: 274,3 [M]⁺; gef.: 273,2 [M]⁺

H-Gly-LVal-Val-OBn/ H-Gly-DVal-Val-OBn (Referenz)

C₁₉H₂₉O₄N₃ (363,5)

BOC-Gly-LVal-OH bzw. BOC-Gly-DVal-OH (0,5 mmol) in 5 ml DCM wurde mit einer Mischung aus DCC (0,5 mmol) und HOBt (0,5 mmol) aktiviert. Nach 3 min wurde H-Val-OBn·HCl (0,5 mmol) und DIEA (0,5 mmol) gelöst in 5 ml DCM addiert. Die

Reaktionsmischung wurde 16 h gerührt, der DCU abgetrennt, nacheinander je 3x mit 5 %iger NaHSO₄-, 5 %iger NaHCO₃-Lösung und H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, im Vakuum eingeengt und mit n-Hexan verrieben. Die Abspaltung der BOC-Gruppe wurde mit 1,5 ml TFA für 30 min durchgeführt.

H-Gly-LVal-Val-OBn und H-Gly-DVal-Val-OBn in DMF wurden in verschiedenen Mengenverhältnissen (Anteil LDL-Peptid 5; 1; 0,5; 0,2 %) vermischt und mittels HPLC analysiert. Der 0,2 %ige LDL-Isomeranteil konnte nachgewiesen werden.

Um die Ausbeute an Tripeptid während der einzelnen Reaktionen mittels HPLC bestimmen zu können, wurde die Methode zuvor geeicht. Dazu wurden von der Aminokomponente H-Val-OBn·HCl und vom Reaktionsprodukt H-Gly-L/DVal-Val-OBn Lösungen verschiedener Konzentrationen (0,003 mmol; 0,00225 mmol; 0,0015 mmol; 0,00075 mmol; 0,0003 mmol in je 1 ml Laufmittel B) mit HPLC analysiert und die Peakflächen mit der Konzentration ins Verhältnis gesetzt. Die dabei erhaltenen Verhältnisse wurden später verwendet, um aus den HPLC-Peakflächen die Konzentrationen zu bestimmen. Die Ausbeute wurde daraus nach der Formel

$$\text{Ausbeute} = c_{\text{Reaktionsprodukt}} / (c_{\text{Ausgangsstoff}} + c_{\text{Reaktionsprodukt}}) \text{ berechnet.}$$

HPLC-Gradientensystem zur Bestimmung der Epimerisierung: linearer Gradient; 10-60 % B in 25 min; t_R (H-Gly-LVal-Val-OBn): 18,8 min; t_R (H-Gly-DVal-Val-OBn): 20,1 min; t_R (H-Val-OBn·HCl): 13,8 min; Keine Nebenprodukte wurden beobachtet.

Z-Gly-L/DAla-Leu-pNA (Referenz)

C₂₅H₃₁O₇N₅ (513,6)

Z-Gly-LAla-OH bzw. Z-Gly-DAla-OH (0,1 mmol) wurde zusammen mit TBTU (0,1 mmol) in 1 ml DMF gelöst und mit H-Leu-pNA (0,1 mmol) unter Zusatz von DIEA (0,2 mmol) umgesetzt. Nach 10 min wurde das DMF im Vakuum entfernt und die Reaktionsprodukte wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Für die Ermittlung der Ausbeuten mittels HPLC wurde die Eichung in Analogie zum oben genannten Verfahren mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen von H-Leu-pNA und Z-Gly-L/DAla-Leu-pNA (0,005 mmol; 0,00375 mmol; 0,0025 mmol; 0,00125 mmol; 0,0005 mmol in je 1 ml Laufmittel B) vorgenommen.

HPLC-Gradientensystem zur Bestimmung der Epimerisierung: linearer Gradient; 25-60 % B in 60 min; t_R (Z-Gly-LAla-Leu-pNA): 43,5 min; t_R (Z-Gly-DAla-Leu-pNA): 42,2 min; t_R (H-Leu-pNA): 8,0 min

7.8. Epimerisierungsuntersuchungen

Epimerisierung während der Synthese von Z-Gly-Ala-Leu-OBn mittels bekannter und neuer modifizierter Kupplungsreagenzien (Kapitel 2.1.,2.2.)

0,3 mmol Z-Gly-LAla-OH und 0,3 mmol H-Leu-OBn-TosOH wurden mit 0,33 mmol Kupplungsreagenz in 1 ml DMF gelöst und nach Zugabe von 0,9 mmol DIEA bei RT 100 min gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erfolgte die Aufarbeitung, katalytische Hydrierung und HPLC-Analyse analog zu den oben genannten Bedingungen (Kapitel 7.7.).

Epimerisierung der BOC-Gly-Val-Aktivester

Zur Untersuchung der Stereomutation der Aktivester am Modell BOC-Gly-LVal-Val-OBn wurde bei RT eine Mischung aus BOC-Gly-Val-OH (0,3 mmol) und DCC (0,33 mmol) in 400 µl DCM 10 min lang gerührt, um das Oxazolone zu erhalten. Nach der Abtrennung des DCU und der Addition der N-Hydroxyverbindung (0,3 mmol) wurde die Lösung mit 500 µl DMF verdünnt (Verhältnis DCM/DMF = 1:1,3). Bei einer Vorinkubationszeit von 60 s wurde DIEA (0,3 mmol) addiert. Im Fall des ONB-Esters wurde eine längere Bildungszeit verwendet (5 min in DCM, nach Verdünnung mit DMF 16 h) (Kapitel 3.3.1.).

Eine Mischung aus H-Val-OBn-HCl (0,3 mmol) und DIEA (0,3 mmol) in 600 µl DMF wurde danach zur Aktivesterlösung hinzugefügt.

Wurde die Reaktion ohne Vorinkubation aber in Gegenwart von Base durchgeführt, wurden 0,6 mmol DIEA zusammen mit der Aminokomponente addiert (Kapitel 3.3.2.).

Für die Abspaltung der BOC-Gruppe wurden 10 µl Aliquote in je 100 µl TFA überführt und die Lösungen für 30 min stehen gelassen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und jeweils 1 ml Eluant B für die HPLC-Analyse (Bedingungen Kapitel 7.7.) addiert.

Epimerisierung bei Anwendung der Uroniumsalze (Kapitel 3.3.2.)

DIEA (0,09 mmol) wurde bei RT zu einer Mischung bestehend aus BOC-Gly-Val-OH (0,03 mmol), Kupplungsreagenz (0,03 mmol) und H-Val-OBn-HCl (0,03 mmol) in 50 µl DMF addiert, und 10 µl Aliquote der Lösung wurden wie oben beschrieben behandelt.

Zur Untersuchung des Einflusses der Voraktivierung wurde eine Mischung aus BOC-Gly-Val-OH und Uroniumsalz gelöst in 40 µl DMF mit 2 Äq. DIEA (0,06 mmol) bei RT 60 s lang behandelt. H-Val-OBn-HCl und 1 Äq. DIEA (0,03 mmol) in 60 µl DMF

wurden danach hinzugefügt, 10 µl Aliquote wie oben beschrieben weiterverarbeitet und chromatographiert (Kapitel 7.7.).

Epimerisierung während der Mischanhydridsynthese (Kapitel 4.)

Zur Untersuchung der Menge an LDL-Isomer bei der Mischanhydridsynthese entsprechend Weg 1 (Abb. 24) wurde das Mischanhydrid von BOC-Gly-Val-OH (0,3 mmol) innerhalb einer Bildungszeit von 5 min mit Chlorameisensäureisobutylester (0,3 mmol)/ NMM (0,3 mmol) bei -13°C in 1 ml Essigester synthetisiert. Durch Addition der N-Hydroxyverbindung (0,45 mmol)/ NMM (0,15 mmol) in 2 ml Essigester wurden die Aktivester erhalten. Nach 2 h Rühren wurde eine Mischung aus H-Val-OBn·HCl (0,3 mmol)/ NMM (0,3 mmol) in 1 ml Essigester addiert und 40 µl Proben in je 100 µl TFA zur BOC-Abspaltung überführt. Die HPLC-Bedingungen waren identisch zu den in Kapitel 7.7. beschrieben.

Bei Durchführung der Synthese entsprechend Weg 2 (Abb. 25) wurde der Aktivester bei -13°C in 3 ml Essigester unter Verwendung von ClCOOBt (0,3 mmol)/ NMM (0,3 mmol) hergestellt. Die Mischung wurde 30 min gerührt und anschließend die Kupplung wie oben beschrieben durchgeführt.

Epimerisierung von Peptidfluoriden (Kapitel 5.1., Tab. 9)

Die Säurefluoridbildung, die am Modell Z-Gly-Ala-Leu-pNA (HPLC-Bedingungen Kapitel 7.7.) untersucht wurde, erfolgte durch Aktivierung von 0,1 mmol Dipeptid in 1 ml DCM mit 0,1 mmol DIC unter Zusatz von 5 oder 1,5 Äq. Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplex bei RT für 5 min (5 Äq. HF) bzw. 15 min (1,5 Äq. HF). Anschließend wurde die Aminolyse durch Addition von Leu-pNA (0,1 mmol)/ BSA (0,1 mmol) gelöst in 1 ml DCM oder 1 ml DMF durchgeführt.

Im Fall der DMF-Addition (1 ml) während des Aktivierungsschrittes wurde die Aminolyse 1 min nachdem das DMF addiert wurde gestartet.

Vergleichsreaktionen der OAt- und OBt-Ester wurden durchgeführt durch Aktivesterbildung in 1 ml DCM (je 0,1 mmol: Dipeptid, DIC, HOAt oder HOBt) bei RT innerhalb von 5 min und anschließender Kupplung mit äquimolaren Mengen Leu-pNA/BSA in 1 ml DMF.

100 bzw. 150 µl Aliquote (0,005 mmol) wurden in je 1 ml Laufmittel B für die HPLC-Analyse überführt.

Epimerisierung bei der Kupplung durch Uroniumsalz/ Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Komplex (Kapitel 5.2.)

Zur Untersuchung des Einflusses des HF-Komplexes zu „Eintopfreaktionen“ wurde zu einer Mischung aus Z-Gly-Ala-OH (0,1 mmol), TBPYU (0,1 mmol), H-Leu-pNA (0,1 mmol) in 2 ml DMF ohne und mit Zusatz von 5 Äq. HF-Komplex bei RT DIEA (0,2 mmol) addiert und anschließend 100 µl (0,005 mmol) Aliquote in 1 ml Laufmittel B für die HPLC-Analyse überführt.

Bei Durchführung der Reaktionen mit Voraktivierung wurde DIEA (1 oder 2 Äq.) zu einer Mischung aus Z-Gly-Ala-OH (0,1 mmol), HAPyU (0,1 mmol), HF-Pyridin (5 oder 10 Äq. = 14 oder 28 µl) in 2 ml DMF bei RT für eine Voraktivierungsperiode von 60 s addiert. Nach der Addition von H-Leu-pNA (0,1 mmol) in 1 ml DMF wurden 150 µl Aliquote (0,005 mmol) in 1 ml Laufmittel B für die HPLC-Analyse überführt. Bei Verwendung der anderen Basen wurde je 1 Äq. NMM oder Collidin zusammen mit 5 oder 10 Äq. HF-Pyridin eingesetzt. Zum Vergleich wurden die Reaktionen auch ohne Zusatz von HF-Pyridin durchgeführt.

Seitenkettenschutzgruppen-Abspaltung bei Verwendung des Pyridin-poly(hydrogenfluorid)-Additivs (Kapitel 5.3.)

Zur Untersuchung der Trityl- und BOC-Abspaltung wurden bei RT Fmoc-Aminosäuren (0,1 mmol) zu Lösungen von je 1 ml DCM oder DMF addiert, die 1,5, 5 oder 10 Äq. des HF-Pyridin-Komplexes enthielten. 20 µl Aliquote wurden in je 1 ml Acetonitril überführt.

HPLC-Bedingungen: linearer Gradient; 10-100 % B in 45 min; Fluß 1 ml/min; tR (Fmoc-Cys(Trt)-OH): 40,5 min und tR (Fmoc-Cys-OH): 25,9 min;

tR (Fmoc-Asn(Trt)-OH): 37,0 min und tR (Fmoc-Asn-OH): 25,8 min;

tR (Fmoc-Lys(BOC)-OH): 30,6 min und tR (Fmoc-Lys-OH): 19,1 min.

Das Ausmaß der Seitenkettenschutzgruppenabspaltung wurde durch Vergleich der ungeschützten und der geschützten Aminosäure bestimmt.

7.9. Segmentkondensation von ACP(65-74) mit HAPyU/ Pyridin- poly(hydrogenfluorid)-Komplex (Kapitel 5.4.)

Schrittweise Festphasensynthese von Fmoc-Val-Gln(Trt)-Ala-Ala-OH (58, 32) am o-Cl-Trt-Harz

$C_{50}H_{53}O_8N_5$ (852,0)

Für die Verankerung von Fmoc-Ala-OH am o-Cl-Trt-Harz (Novabiochem, 1,6 mmol/g) [107] wurden 2 g Harz, 2,4 mmol Fmoc-Ala-OH und 6 mmol DIEA in 20 ml trockenem DCM bei RT 1 h gerührt. Danach wurden 6 ml Methanol und 6 mmol DIEA addiert, 15 min gerührt und zuletzt das filtrierte beladene Harz nacheinander mit DMF, DCM, Isopropanol und Diethylether gewaschen und getrocknet. Zur Bestimmung der Beladung wurden 10 mg Harz mit 1 ml 20 %iger Piperidin/DMF-Lösung versetzt, 15 min gerührt, ein Aliquot (100 µl) mit 1 ml 20 %iger Piperidin/DMF-Lösung verdünnt und davon wiederum ein Aliquot (100 µl) in 1 ml 20 %ige Piperidin/DMF-Lösung überführt. Nach Bestimmung der Extinktion bei 301 nm ergab sich aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz die erreichte Beladung von 0,6 mmol/g.

Die Kupplungen von Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH erfolgten manuell in Analogie zu Standardsyntheseprotokollen unter Verwendung von jeweils 3,6 mmol Aminosäure, 3,6 mmol HBTU und 7,2 mmol DIEA in 0,3 M DMF-Lösungen bei RT. Alle Kupplungen wurden doppelt durchgeführt, wobei die Kupplungszeiten 30 min betrugen. Die Deblockierung der Fmoc-Gruppe erfolgte nach jedem Kupplungsschritt mit 20 %iger Piperidin/DMF-Lösung (3 und 7 min). Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde qualitativ mittels Ninhydrintest verfolgt [112].

Das Peptidharz wurde bei RT 30 min mit einem Gemisch aus DCM/Essigsäure/THF = 8:1:1 gespalten, das Harz anschließend abfiltriert und mit DCM gewaschen. Das Filtrat wurde mit einem Überschuß n-Hexan versetzt, im Vakuum eingeengt, nochmals n-Hexan hinzugefügt und nach dem Einengen auf ca. 2 ml das Rohpeptid mit Diethylether gefällt. Nach Zusatz von Dioxan wurde das Peptid lyophilisiert, um restliche Essigsäure zu entfernen. Die Ausbeute betrug 95 %, bezogen auf die erreichte Harzbeladung.

HPLC-Bedingungen: Shimadzu HPLC System; SPD10A UV-VIS Detektor $\lambda=220$ nm, LC10AS Pumpen, CBM10A Controller, Säulentyp: Vydac 218 TP10415 4×200 mm; Flußrate: 1,0 ml/min; mobile Phase: A H_2O : TFA = 1000:1, B CH_3CN 100 %; linearer Gradient; 10-100 % B in 45 min; tR (Fmoc-Val-Gln(Trt)-Ala-Ala-OH): 30 min

ES-MS: ber.: 853,0 [M+H]⁺; gef.: 853,1 [M+H]⁺; 875,2 [M+Na]⁺; 891,2 [M+K]⁺

Schrittweise Festphasensynthese von H-Ile-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ile-Asn(Trt)-Gly-NH₂ (58, 33) am Sieber-Amidharz

C₅₈H₇₈O₁₀N₈ (1047,3)

Die Synthese der C-terminalen Sequenz erfolgte mit einem Applied Biosystem 433 A Peptidsynthesizer am Sieber-Amidharz (Novabiochem, 0,37 mmol/g) [109] in Analogie zu Standardsyntheseprotokollen. Unter Verwendung von 800 mg Harz (0,296 mmol) wurden die Fmoc-Aminosäuren (1 mmol) bei RT mit HBTU (1 mmol) in Gegenwart von DIEA (1 mmol) bei einer Konzentration von 0,45 M in DMF doppelt gekuppelt (2x30 min). Die Deblockierung der Fmoc-Gruppen erfolgte mit 20 %iger Piperidin/DMF-Lösung für 7 min. Die Abspaltung des Sieber-Harzes wurde mit 20 ml einer Lösung aus 1 % TFA in DCM für 30 min bei RT durchgeführt, das Harz abfiltriert und mit DCM gewaschen. Das Filtrat wurde mit n-Hexan versetzt, im Vakuum eingengt, das Rohpeptid mit Diethylether gefällt und aus Dioxan lyophilisiert.

Ausbeute: 52 % bezogen auf die Harzbeladung

HPLC-Gradientensystem: Bedingungen wie oben; mobile Phase: A H₂O: TFA = 1000:1, B CH₃CN 100 %; linearer Gradient; 10-100 % B in 45 min;

tR (H-Ile-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ile-Asn(Trt)-Gly-NH₂): 26 min

ES-MS: ber.: 1048,3 [M+H]⁺; gef.: 1047,9 [M+H]⁺; 1069,7 [M+Na]⁺

Kupplung von Fmoc-Val-Gln(Trt)-Ala-Ala-OH an H-Ile-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ile-Asn(Trt)-Gly-NH₂ (58, 4)

C₁₀₈H₁₂₉O₁₇N₁₃ (1881,3)

In Analogie zu den Kupplungen in Kapitel 7.8. wurde bei RT DIEA (0,035 mmol) zu einer Mischung aus Fmoc-Val-Gln(Trt)-Ala-Ala-OH (0,035 mmol), HAPyU (0,035 mmol) und a) ohne, b) mit 10 Äq. Pyridin-poly(hydrogenfluorid) (0,35 mmol = 9,8 µl) in 700 µl DMF für eine Voraktivierungszeit von 60 s addiert. Anschließend wurde H-Ile-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ile-Asn(Trt)-Gly-NH₂ (0,035 mmol)/ DIEA (0,035 mmol) in 500 µl DMF zugefügt und 21 h gerührt.

Umsätze der Reaktionen nach 21 h (Kapitel 5.4., Abb. 29): HPLC-Gradientensystem: Bedingungen wie oben; mobile Phase: A H₂O: TFA = 1000:1, B CH₃CN 100 %; linearer Gradient; 10-100 % B in 45 min, anschließend 10 min bei 100 % B; tR (Fmoc-Val-Gln(Trt)-Ala-Ala-Ile-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ile-Asn(Trt)-Gly-NH₂): 45 min; tR (Fmoc-Val-Gln(Trt)-Ala-Ala-OH): 30 min; Reaktionsausbeute a) 82 %, b) 69 %

Das DMF wurde im Vakuum abgetrennt, das Rohpeptid mit Diethylether gefällt und auf der Fritte nacheinander mit 5 %iger NaHSO₄-, 5 %iger NaHCO₃-, gesättigter Na₂CO₃ und 20 %iger NaCl-Lösung gewaschen und getrocknet. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgte mit 2 ml Piperidin für 15 min. Danach wurde das Peptid mit Diethylether gefällt, getrocknet und die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen in 5 ml 95 % TFA/H₂O/ 3 % Triisopropylsilan für 90 min durchgeführt. Die Lösung wurde im Vakuum eingedunstet, zweimal Heptan addiert, erneut eingedunstet, das Peptid mit Diethylether gefällt und schließlich aus 10 % Essigsäure/H₂O lyophilisiert.

C₄₇H₇₅O₁₅N₁₃ (1062,2)

HPLC-Bedingungen wie oben, tR (H-Val-Gln-Ala-Ala-Ile-Asp-Tyr-Ile-Asn-Gly-NH₂): 12 min

ES-MS (Kapitel 5.4., Abb. 30):

a) ber.: 1063,2 [M+H]⁺; gef.: 1062,8 [M+H]⁺; 1085,0 [M+Na]⁺; 550,8 [M+K]²⁺

b) ber.: 1063,2 [M+H]⁺; gef.: 1062,9 [M+H]⁺; 1085,1 [M+Na]⁺; 551,1 [M+K]²⁺

in beiden Fällen weiterer Peak bei 388,3 [M+H]⁺ entspricht Val-Gln-Ala-Ala

Der gebildete Anteil D-Ala aus den Reaktionen a) und b) wurde mittels GC-MS bestimmt.

8. Literaturverzeichnis

- [1] *European J. Biochem.* **1984**, 138, 9.
- [2] Bayer, E.: *Angew. Chem.* **1991**, 103, 117.
- [3] Bodanszky, M. *Principles of Peptide Synthesis* Berlin, Springer Verlag, **1984**.
- [4] Tilak, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1970**, 11, 849.
- [5] Denkwalter, R. G.; Schwam, H.; Strachan, R. G.; Beesley, T. E.; Veber, D. F.; Schoenewaldt, E. F.; Barkemeyer, H.; Paleveda, W. J., Jr.; Jakob, T. A.; Hirschmann, R. *J. Amer. Chem. Soc.* **1966**, 88, 3163.
- [6] Kisfaludy, L.; Schön, I.; Szirtes, T.; Nyéki, O.; Löw, M. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 19, 1785.
- [7] Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E., Jr.; Sadat-Aalae, S. Y.; Tien, J.-H.; Langridge, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 3732.
- [8] a) Beyermann, M.; Bienert, M.; Niedrich, H.; Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 721.
- b) Granitza, D. Dissertation, Berlin **1996**.
- [9] Merrifield, R. B. *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.
- [10] Mutter, M.; Hagenmaier, H.; Bayer, E. *Angew. Chem.* **1971**, 83, 883.
- [11] Gairí, M.; Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1995**, 46, 119.
- [12] Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron* **1993**, 49, 11065.
- [13] Kent, S. B. H. *Ann. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 957.
- [14] Benz, H. *Synthesis* **1994**, 337
- [15] Kent, S. B. H. Deber, C. M.; Hruby, V. J.; Kopple, K. D., Eds.; In *Peptides, Structure and Function*. Proceedings of the 9th American Peptide Symposium; Rockford, Illinois, Pierce Chem. Company: **1985**; 407.
- [16] Narita, M.; Fukunaga, T.; Wakabayashi, A.; Ishikawa, K.; Nakano, H. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1984**, 24, 580.
- [17] Kuroda, H.; Chen, Y.-N.; Kimura, T.; Sakakibara, S. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, 40, 294
- [18] a) Thaler, A.; Seebach, D.; Cardinaux, F. *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74, 617.
- b) Thaler, A.; Seebach, D.; Cardinaux, F. *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74, 628.

- [19] Toniolo, C.; Valle, G.; Bonora, G. M.; Crisma, M.; Moretto, V.; Izdebski, J.; Pelka, J.; Pawlac, D.; Schneider, C. H. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1988**, 31, 77.
- [20] Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927.
- [21] Benoiton, N. L.; Lee, Y. C.; Steinauer, R.; Chen, F. M. F. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, 40, 559.
- [22] Carpino, L. A.; El-Faham, A. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 695.
- [23] Jones, J. *The Chemical Synthesis of Peptides. International Series of Monographs on Chemistry*, 23, Oxford, Oxford Science Publications Clarendon Press: **1991**.
- [24] Kemp, D. S. Gross, E.; Meienhofer, J., Eds.; In *The Peptides Analysis, Synthesis, Biology Vol. 1*, New York, Academic Press, Inc.: **1979**.
- [25] Kovács, J. Gross, E.; Meienhofer, J., Eds.; In *The Peptides Analysis, Synthesis, Biology Vol. 2*, New York, Academic Press, Inc.: **1980**.
- [26] Wünsch, E. Müller, E., Ed.; In *Synthese von Peptiden. Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl). Bd. XV/1*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag: **1974**; 39.
- [27] Goodman, M.; Glaser, C. Weinstein, B; Lande, S., Eds.; In *Peptides, Chemistry and Biochemistry. Proceedings of the 1st American Peptide Symposium 1968*; New York, Marcel Dekker, **1970**; 267.
- [28] Goodman, M.; McGahren, W. J. *Tetrahedron* **1967**, 23, 2031.
- [29] Jakubke, H.-D. *Peptide: Chemie und Biologie*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag: **1996**.
- [30] Griehl, C.; Jeschkeit, H. *Z. Chem.* **1988**, 28, 439.
- [31] Benoiton, N. L., Chen, F. M. F. *Can. J. Chem.* **1981**, 59, 384.
- [32] Griehl, C.; Kolbe, A.; Merkel, S. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2* **1996**, 2525.
- [33] Bodanszky, M. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1985**, 25, 449.
- [34] Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Amer. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067.
- [35] Weygand, F.; Hoffmann, D.; Wünsch, E. *Z. Naturforschung* **1966**, 21 b, 426.
- [36] Curtius, T. *Ber. dtsch. Chem. Ges.* **1902**, 35, 3226.
- [37] Gross, H.; Bilk, L. *Tetrahedron* **1968**, 24, 6935.
- [38] Weygand, F.; Steglich, W.; Chytil, N. *Z. Naturforschung* **1968**, 23 b, 1391.
- [39] Fujino, M.; Kobayashi, S.; Obayashi, M.; Fukuda, T.; Shinagawa, S; Nishimura, O. *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, 22, 1857.
- [40] König, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788.

- [41] König, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2024.
- [42] Miyazawa, T.; Otomatsu, T.; Yamada, T.; Kuwata, S. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 771.
- [43] Miyazawa, T.; Otomatsu, T.; Fukui, Y.; Yamada, T.; Kuwata, S. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, *39*, 237.
- [44] Griehl, C.; Weigt, J.; Jeschkeit, H. *J. High Resolution Chromatography* **1994**, *17*, 700.
- [45] Hudson, D. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 617.
- [46] Beyermann, M.; Henklein, P.; Klose, A.; Sohr, R.; Bienert, M. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 252.
- [47] Miyazawa, T.; Otomatsu, T.; Fukui, Y.; Yamada, T.; Kuwata, S. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, *39*, 308.
- [48] Haver, A. C.; Smith, D. D. Maia, H. S. L., Ed.; In *Peptides 1994. Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium, Braga*; Leiden, ESCOM: **1995**; 199.
- [49] a) Castro, B.; Dormoy, J.-R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *14*, 1219.
- b) Castro, B.; Dormoy, J.-R.; Dourtoglou, B.; Evin, G.; Selve, C.; Ziegler, J.-C. *Synthesis* **1976**, 751.
- [50] Dourtoglou, V.; Gross, B.; Lambropoulou, V.; Zioudrou, C. *Synthesis* **1984**, 572.
- [51] Henklein, P.; Beyermann, M.; Bienert, M.; Knorr, R. Giralt, E.; Andreu, D., Eds.; In *Peptides 1990. Proceedings of the 21st European Peptide Symposium*; Leiden, ESCOM: **1991**; 67.
- [52] Carpino, L. A. *J. Amer. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- [53] Albericio, F.; Carpino, L. A. *Methods in Enzymology* **1997**, *289*, 104.
- [54] Abdelmoty, I.; Albericio, F.; Carpino, L. A.; Foxman, B. M.; Kates, S. A. *Lett. in Peptide Science* **1994**, *1*, 57.
- [55] Henklein, P.; Costisella, B.; Wray, V.; Domke, T.; Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Kates, S. A.; Abdelmoty, I.; Foxman, B. M. In *Peptides 1996. Proceedings of the 24th European Peptide Symposium, Edinburgh*, im Druck.
- [56] Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Truran, G.; Albericio, F.; Kates, S. A.; Shroff, H.; Triolo, S. A.; Hodges, R. S.; Smith, J.A., Eds.; In *Peptides, Chemistry, Structure and Biology. Proceedings of the 13th American Peptide Symposium 1993*; Leiden, ESCOM: **1994**; 124.

- [57] Kneib-Cordonier, N.; Albericio, R.; Barany, G. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, 35, 527.
- [58] Nokihara, K.; Hellstern, H.; Höfle, G. Rivier, J. E.; Marshall, G. R., Eds.; In *Peptides, Chemistry, Structure and Biology. Proceedings of the 11th American Peptide Symposium*; Leiden, ESCOM: **1990**; 1046.
- [59] Benoiton, N. L. *Biopolymers* **1996**, 245.
- [60] Steinauer, R.; Chen, F. M. F.; Benoiton, N. L. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1989**, 34, 295.
- [61] Henklein, P.; Beyermann, M.; Costisella B.; Sohr, R. Epton, R., Ed.; In *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis*; Andover, Intercept Limited, **1992**; 349.
- [62] Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2279.
- [63] Griehl, C.; Jäger, L.; Plass, M.; Kolbe, A. In *Peptides 1996. Proceedings of the 24th European Peptide Symposium, Edinburgh*, im Druck.
- [64] Benoiton, N. L.; Lee, Y. C.; Chen, F. M. F. Maia, H. S. L., Ed.; In *Peptides 1994. Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium, Braga*; Leiden, ESCOM: **1995**; 203.
- [65] Anderson, G. W.; Callahan, F. M.; Zimmerman, J. E. *J. Amer. Chem. Soc.* **1967**, 89, 178.
- [66] Berger, E.; Neubert, K.; Bang, H.; Jakubke, H. D. *Z. Chem.* **1982**, 22, 379.
- [67] Chen, F. M. F.; Lee, Y.; Steinauer, R.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 613.
- [68] Chen, F. M. F.; Steinauer, R.; Benoiton, N. L. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 2939.
- [69] Wünsch, E. Müller, E., Ed.; In *Synthese von Peptiden. Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl). Bd. XV/2*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 1974; 15.
- [70] Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; Chao, H. G.; DeSelms, R. H. *J. Amer. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9651.
- [71] Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Krause, E.; Brudel, M.; Winter, R.; Schümann, M.; Carpino, L. A.; Bienert, M. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3275.
- [72] Wenschuh, H.; Beyermann, M.; El-Faham, A.; Ghassemi, S.; Carpino, L. A.; Bienert, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 669.
- [73] Izumiya, N.; Muraoka, M. *J. Amer. Chem. Soc.* **1969**, 91, 2391.

- [74] Miyazawa, T.; Donkai, T.; Yamada, T.; Kuwata, S. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, *40*, 49.
- [75] Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205.
- [76] Carpino, L. A.; Beyermann, M.; Wenschuh, H.; Bienert, M. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268.
- [77] Carpino, L. A.; El-Faham, A. *J. Amer. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5401.
- [78] Hanay, C.; Beyermann, M.; Winter, R.; Henklein, P.; Flechsler, I.; Kraas, W.; Jung, G., Eds.; In *Programm und Abstracts des 2. Deutschen Peptidkolloquiums, Tübingen*; **1995**; P23.
- [79] Coste, J.; Frérot, E.; Jouin, P.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1967.
- [80] Akaji, K.; Kuriyama, N.; Kiso, Y. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3315.
- [81] Hoeprich, P. D., Jr. Epton, R., Ed.; In *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis*; Andover, Intercept Limited, **1992**; 49.
- [82] Coste, J.; Frérot, E.; Jouin, P. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437.
- [83] Teichmann, H.; Auerswald, C. *J. f. prakt. Chemie* **1979**, *321*, 835.
- [84] Hanay, C.; Carpino, L. A.; Henklein, P.; El-Faham, A., in Vorbereitung.
- [85] Henklein, P.; Carpino, L. A., unveröffentlichte Ergebnisse.
- [86] Barlos, K.; Papaioannou, D.; Theodoropoulos, D. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1984**, *23*, 300.
- [87] Hanay, C.; Beyermann, M.; Henklein, P. Epton, R., Ed.; In *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis*; Mayflower Scientific Limited, **1996**; 389.
- [88] Hanay, C.; Beyermann, M.; Winter, R.; Henklein, P., in Vorbereitung.
- [89] Horiki, K. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *22*, 1897.
- [90] Katritzky, A. R.; Malhotra, N.; Fan, W.-Q.; Anders, E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1991**, 1545.
- [91] Ames, D. E.; Grey, T. F. *J. Chem. Soc.* **1955**, 631.
- [92] Koppel, I.; Koppel, J.; Leito, I.; Pihl, V.; Grehn, L.; Ragnarsson, U. *J. Chem. Research (S)* **1993**, 446.
- [93] Hanay, C.; Beyermann, M.; Henklein, P. In *Peptides 1996. Proceedings of the 24th European Peptide Symposium, Edinburgh*, im Druck.
- [94] Benoiton, N. L.; Lee, Y.; Chen, F. M. F. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1988**, *31*, 443.

- [95] Henklein, P.; Halatsch, W.-R.; Heyne, H.-U. *Z. Chem.* **1986**, 26, 329.
- [96] Böttcher, M.; Henklein, P.; Fabian, H.; Niedrich, H. *Z. Chem.* **1989**, 29, 70.
- [97] Henklein, P.; Ott, T.; Jährling, R.; Scharfenberg, P.; Heyne, H.-U.; Niedrich, H. *Z. Chem.* **1989**, 29, 289.
- [98] Kaduk, C.; Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Forner, K.; Carpino, L. A.; Bienert, M. *Lett. in Peptide Science* **1995**, 2, 285.
- [99] Middleton, W. J. *J. Org. Chem.* **1975**, 40, 574.
- [100] Olah, G. A.; Welch, J. T.; Vankar, Y. D.; Nojima, M.; Kerekes, I.; Olah, J. A. *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 3872.
- [101] Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Winter, R.; Bienert, M.; Ionescu, D.; Carpino, L. A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 5483.
- [102] Kusomoto, S.; Matsukura, M.; Shiba, T. *Biopolymers* **1981**, 20, 1869.
- [103] Bordwell, F. G. *Acc. Chem. Res.* **1988**, 21, 456.
- [104] Jedrzejczak, M.; Motie, R. E.; Satchell, D. P. N., Satchell, R. S., Wassef, W. N. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 1471.
- [105] Johnson, T; Quibell, M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 463.
- [106] Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Minor, C. A.; Albericio, F. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201.
- [107] a) Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, J.; Papaphotiu, G.; Sotiriu, P.; Wenqing, Y.; Schäfer, W. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 3943.
- b) Barlos, K.; Chatzi, O.; Gatos, D.; Stavropoulos, G. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 37, 513.
- [108] Bollhagen, R.; Schmiedberger, M.; Barlos, K.; Grell, E. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2559.
- [109] Sieber, P. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2107.
- [110] Akaji, K.; Kuriyama, N.; Kimura, T.; Fujiwara, Y., Kiso, Y. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 3177.
- [111] Carpino, L. A.; persönliche Mitteilung.
- [112] Harding, V. J.; MacLean, R. M. *J. Biol. Chem.* **1916**, 24, 503.

9. Anhang

Spektroskopische Daten

Tab. 12: ^{13}C -chemische Verschiebungen in ppm der Reaktion von Mesitylencarbonsäurechlorid mit Bipyrrolidinoharnstoff und SbCl_5 bei -50°C, -5°C und 20°C, gemessen in CD_2Cl_2 (0,4 M), und Signale von Vergleichsspektren

-50°C	-5°C	20°C	isolierte uroniumverbindung (Kapitel 7.4.)	O-Acyl- Mesitylencarbonsäure- chlorid, -50°C	Mesitylencarbonsäure, 20°C	Bipyrrolidino- harnstoff, -50°C	Bipyrrolidinoharnstoff · SbCl_5 , -50°C
170,1 (Cl)				170,6 (COCl)	176,1 (COOH)		
161,6 (CO)	161,5	162,2	162,1			160,8 (C=O)	
155,2							156,1 (CO)
152,1 (C⁺)	152,4	153,3	153,2				
144,2 (Cq)	144,2	144,9	144,8				
140,7 (Cl)				140,7 (Cq)	140,6 (Cq)		
140,3 (2Cq)	140,1	140,9	140,8				
135,1 (Cl)				135,3 (Cq)	136,4 (2Cq)		
132,5 (Cl)				132,6 (2Cq)			
130,2 (2CHarom)	130,2	131,0	130,9		129,7 (Cq)		
128,6					129,0 (2CHarom)		
128,1 (Cl)	128,1 (s)			128,1 (2CHarom)			
121,6 (Cq)	121,7	122,5	122,5				
51,4 (2CH₂N)	51,4	52,3	51,5				51,3 (2CH ₂ N)
50,7 (2CH₂N)	50,7	51,6	50,4				50,7 (2CH ₂ N)
48,8	49,5	50,5				47,6 (4CH ₂ N)	
25,8 (2CH₂)	25,7	26,5	25,4			25,2 (4CH ₂)	25,7 (2CH ₂)
23,7 (2CH₂)	23,6	24,3	24,2				24,0 (2CH ₂)
22,5 (2CH₃)	22,1	22,7	22,6				
21,0 (1CH₃)	20,7	21,4	21,3		21,2 (1CH ₃)		
20,8 (Cl)				20,3 (1CH ₃)	20,3 (2CH ₃)		
19,9							
19,2 (Cl)	19,0 (s)			19,2 (2CH ₃)			

(s) klein; (Cl) Mesitylencarbonsäurechlorid; fett gedruckt sind Signale von $\text{Mesit(Py)}_2^+ \text{SbCl}_6^-$

Tab. 13: ^{13}C -chemische Verschiebungen in ppm der Aktivierung von Mesitylencarbonsäure mit HAPyU in Gegenwart von Collidin bei -50°C , -5°C und 20°C , gemessen in CD_2Cl_2 (0,4 M), und Signale von Vergleichsspektren

-50°C	-5°C	20°C	Mesit-Oat-Ester, -5°C	Mesit-Oat-Ester, 20°C (APT)	HAPyU + Collidin, -50°C	Collidin, -50°C	Collidin, 20°C	Collidin $^+\text{PF}_6^-$, 20°C	MesitOH + Collidin, -50°C	MesitOH + Collidin, 20°C
175,3 (MesitOH/Collidin) (s)									174,3 (COO $^-$)	173,9
165,5 (OAt)	165 7	165,7 (OAt)	165,8 (CO)	165,9						
162,0 (CO)	162,0 (ss)									
160,8 (Harnstoff)	160,9	160,9						160,4 (Cq)		
154,5 (MesitOH/Collidin)	157,4 (Collidin)	158,1			156,4 (Collidin)	157,0	157,8 (2Cq)		154,8 (Collidin $^+$)	156,3
153,6 (C$^+$)										
	153,0 (Collidin $^+\text{PF}_6^-$)	152,9						152,9 (2Cq)		
152,1 (OAt)	152,3 (OAt)	152,1 (OAt)	152,2 (CHoat)	152,2					151,8 (Collidin $^+$)	151,1
149,7 (HAPyU/Collidin)	149,9 (s)				149,4 (CH)					
148,5 (HAPyU/Collidin)	148,8 (s)				147,9 (Collidin)	147,4	147,7 (Cq)			
144,4 (HAPyU/Collidin)	144,9 (ss)				144,2 (C $^+$)					
144,1 (Cq)	144,2 (ss)									
142,4 (OAt)	142,5	142,5 (OAt)	142,6 (Cq)	142,6	141,9 (Cq)					
141,7 (OAt)	140,5	141,0 (OAt)	140,6 (Cq)	140,5						
140,3 (2Cq)										
137,3 (OAt)	137,5	137,4 (OAt)	137,6 (2Cq)	137,8						
136,8 (MesitOH/Collidin)									137,0 (Cq)	138,0
134,9 (OAt)	135,0	135,0 (OAt)	135,2 (Cq)	135,3						
134,7 (MesitOH/Collidin)									135,1 (Cq)	134,8
132,5 (MesitOH/Collidin)									132,9 (Cq)	134,1
130,4 (2CHarom)	130,6 (s)									
129,3 (OAt)	129,4	129,3 (OAt)	129,5 (Choat)	129,6						
128,8 (OAt)	129,0	129,0 (OAt)	129,1 (2Charom)	129,2						
128,1 (HAPyU/Collidin)					127,8 (CH)					
127,5 (MesitOH/Collidin)									127,5 (2CHarom)	128,3
125,8 (HAPyU/Collidin)	124,9	125,1 (OAt)	124,2 (Cq)	124,6	125,7 (Cq)			125,8 (2CHarom)		
123,7 (HAPyU/Collidin)					123,4 (CH)					
122,2 (Cq)									122,8 (Collidin $^+$)	122,8
121,2 (OAt)	121,3	121,2 (OAt)	121,2 (Choat)	121,2	120,9 (Collidin)	120,8	121,2 (2CHarom)			
119,4 (HAPyU/Collidin)	119,9 (s)				117,4					
51,4 (2CH$_2$N)	51,7 (s)				53,1 (2CH $_2$ N)					
50,5 (2CH$_2$N)	50,8 (s)				51,3 (2CH $_2$ N)					
47,9 (Harnstoff)	48,3	48,3								
25,9 (2CH$_2$)	26,1 (s)				25,8 (2CH $_2$)					
25,3 (Harnstoff)	25,5	25,5								
24,2 (HAPyU/Collidin)	24,3 (ss)				24,0 (Collidin)	23,9	24,3 (2CH $_3$)			
23,8 (2CH$_2$)	24,0 (ss)				23,0 (2CH $_2$)					
22,2 (2CH$_3$)	22,3 (ss)							22,2 (1CH $_3$)		
21,2 (OAt)	21,6	21,6 (OAt)	21,3 (1CH $_3$)	21,4					21,2 (2CH $_3$)	22,2
21,0 (MesitOH/Collidin)	21,2	21,1							21,0 (Collidin $^+$)	21,2
20,7 (1CH$_3$)									20,8 (1CH $_3$)	
20,3 (OAt)	20,2	20,0 (OAt)	20,3 (2CH $_3$)	20,3	20,1 (Collidin)	20,5	20,8 (1CH $_3$)			
19,3 (MesitOH/Collidin)	19,9	19,7						19,4 (2CH $_3$)	19,3 (Collidin $^+$)	19,7

(s) klein; (ss) sehr klein; (OAt) Mesitylencarbonsäure-Oat-Ester; (Harnstoff) Bipyrrolidinoharnstoff; fett gedruckt sind Signale von Mesit(Py) $_2^+ \text{PF}_6^-$

Tab. 14: ^{13}C -chemische Verschiebungen in ppm der Aktivierung von Mesitylencarbonsäure mit 1-(1-Pyrrolidiny1-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylmethyl)pyrrolidiniumhexachloroantimonat-N-Oxid (Abb. 12, **19b**, Kapitel 3.1.1.) in Gegenwart von 1 Äq. Collidin bei -50°C , -5°C und 20°C , gemessen in CD_2Cl_2 (0,4 M), (siehe Abb. 13) und **19b**/Collidin zum Vergleich

-50°C	-5°C	20°C	19b + Collidin ($\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{CD}_3\text{CN}$), -50°C
174,4 (MesitOH/Collidin)			
161,8 (CO)	161,2 (ss)		
154,4 (C⁺)	154,3		156,5 (Collidin)
		152,8 (Collidin ⁺ PF ₆ ⁻)	
152,2 (Oat)	152,2 (OAt)	152,3 (OAt)	
148,3 (19b/Collidin)			149,3 (CH)
			147,2 (Collidin)
144,3 (Cq)			
142,5 (OAt)		142,5 (OAt)	
		140,0 (OAt)	
140,3 (2Cq)	140,7 (ss)		
137,3 (OAt)	137,5	137,7 (OAt)	
136,8 (MesitOH/Collidin)			
135,3 (OAt)	135,5	135,2 (OAt)	
134,8 (MesitOH/Collidin)			
132,6 (MesitOH/Collidin)	133		
130,4 (2CHarom)	130,7		
129,4 (OAt)	129,4	129,5 (OAt)	
128,7 (OAt)	129,0	129,2 (OAt)	
127,3 (MesitOH/Collidin)	127,9		127,6 (CH)
		125,7 (OAt)	
	123,7 (19b/Collidin)		123,5 (CH)
122,9 (Cq + 19b/Collidin)			
121,3 (OAt)	121,2	121,3 (OAt)	120,5 (Collidin)
119,1 (19b/Collidin)	119,5		
			117,3
51,4 (2CH₂N)	51,9		52,6 (2CH ₂ N)
50,7 (2CH₂N)	51,2		51,2 (2CH ₂ N)
47,7 (Harnstoff)	48,1	48,5	
25,9 (2CH₂)	26,2		25,7 (2CH ₂)
25,3 (Harnstoff)	25,5	25,7	
23,8 (2CH₂)	24,1		24,0 (Collidin)
22,5 (2CH₃)	22,6	22,1	23,2 (2CH ₂)
21,0 (OAt)	21,4	21,4 (OAt)	
20,7 (1CH₃)	20,9		
20,2 (OAt)	20,2	20,3 (OAt)	
19,2 (MesitOH/Collidin)	19,5	19,9	19,9 (Collidin)

(ss) sehr klein; (OAt) Mesitylencarbonsäure-OAt-Ester; (Harnstoff) Bipyrrolidinoharnstoff; fett gedruckt sind Signale von Mesit(Py)₂⁺ SbCl₆⁻

Tab. 15: ^{13}C -chemische Verschiebungen in ppm der Aktivierung von Mesitylencarbonsäure mit HAPyU in Gegenwart von Collidin bei Raumtemperatur, gemessen in CD_2Cl_2 (0,4 M)

Zeit (min): 2,5	10	20	40	60	120
	165,4 (OAt)	165,9	165,8	165,9	165,8
161,1 (Harnstoff)	161,0	161,1	161,1	161,1	161,1
	159,4 ($\text{Collidin}^+\text{PF}_6^-$)	159,4	159,5	159,6	159,6
152,8	152,6 ($\text{Collidin}^+\text{PF}_6^-$)	152,6	152,6	152,6	152,6
152,3 (OAt)	152,2	152,3	152,3	152,3	152,3
142,6 (OAt)		142,6	142,6	142,6	142,6
			140,9 (OAt)	140,9	140,9
137,6 (OAt)	137,6	137,6	137,6	137,6	137,6
	136,4	136,4	136,4	136,4	136,4
135,3 (OAt)		135,2	135,2	135,2	135,2
129,5 (OAt)	129,4	129,4	129,4	129,4	129,4
129,2 (OAt)	129,2	129,2	129,2	129,2	129,2
125,5 ($\text{Collidin}^+\text{PF}_6^-$)	125,6	125,7	125,7	125,7	125,7
			124,4 (OAt)	124,4	124,4
121,3 (OAt)	121,3	121,3	121,3	121,3	121,3
48,4 (Harnstoff)	48,4	48,4	48,4	48,4	48,4
25,6 (Harnstoff)	25,6	25,6	25,6	25,6	25,6
21,8 ($\text{Collidin}^+\text{PF}_6^-$)	21,9	21,9	21,9	21,9	21,9
21,2 (OAt)	21,2	21,2	21,2	21,3	21,2
20,2 (OAt)	20,2	20,2	20,2	20,2	20,2
19,5 ($\text{Collidin}^+\text{PF}_6^-$)	19,5	19,4	19,4	19,4	19,4

(OAt) Mesitylencarbonsäure-OAt-Ester; (Harnstoff) Bipyrrolidinoharnstoff

Tab. 16: IR-Absorptionsbanden in cm^{-1} der Z-Gly-Ala-Aktivspezies, zusammengestellt aus den kinetischen Messungen

Verbindung	C=O	Urethan-Carbonyl	C=N
Z-Gly-Ala-OH ^a	1660	1728	1564
Z-Gly-Ala-OH/DIEA ^b	1671	1723	1608
Z-Gly-Ala-Oxazon ^b	1828	1728	1683
Z-Gly-Ala-OBt-Ester ^c	1810	1721	1655
Z-Gly-Ala-OAt-Ester ^d	1820	1724	1693
Z-Gly-Ala-ONB-Ester ^{b,e}	1819	1739	1697
Z-Gly-Ala-ONSu-Ester ^{f,g}	1816	1746	1697
Z-Gly-Ala-F ^h	1847	1725	1690

^a Die Daten wurden unter Verwendung der KBr-Preßtechnik erhalten.

^b IR-Analyse erfolgte in 0,1 M DCM-Lösungen unter Verwendung einer NaCl-Küvette.

^c IR-Analyse in 0,1 M DCM-Lösung (NaCl-Küvette) und als KBr-Preßling lieferten analoge Spektren. Kein Hinweis auf die N-acylierte Form des OBt-Esters konnte mittels IR beobachtet werden.

^d IR-Analyse erfolgte in 0,1 M DCM/THF-Lösung (NaCl-Küvette).

^e Eine weitere Carbonylbande des ONB-Restes wurde bei 1781 cm^{-1} beobachtet.

^f IR-Analyse erfolgte in 0,1 M THF-Lösung (NaCl-Küvette).

^g Eine weitere Carbonylbande des ONSu-Restes wurde bei 1790 cm^{-1} beobachtet.

^h IR-Analyse erfolgte in 0,1 M DCM/Dioxan-Lösung (NaCl-Küvette).

Tab. 17: ¹H-NMR-spektroskopische Daten der Z-Gly-Ala-Aktivspezies, die während der verschiedenen kinetischen Messungen auftreten, aufgenommen in CD₂Cl₂/DMF-d₇, die chemischen Verschiebungen sind in ppm zusammen mit der Linienform und der Nummer der Protonen angegeben

Verbindung	CH ₃ (Ala)	CH ₂ (Gly)	CH (Ala)	CH ₂ (Z)	Phenylprotonen	NH (Gly)	NH (Ala)	Andere
Z-Gly-Ala-OH ^a	1,36 d (3)	3,83 d (2)	4,43 quin (1)	5,13 s (2)	7,30-7,45 m (5)	7,15 t (1)	7,92 d (1)	
Z-Gly-Ala-OH/DIEA	1,35 d (3)	3,82 d (2)	4,20 quin (1)	5,15 s (2)	7,35-7,45 m (5)	7,52 t (1)	7,85 d (1)	DIEA: 1,1-1,45 d (12) 2(CH ₃) ₂ + t (3) CH ₃ ; 2,95 quart (2) CH ₂ ; 3,49 hept (2) 2CH
Z-Gly-Ala-Oxazolon ^{a,b}	1,39 d (3)	4,16 dd (2)	4,35 quart (1)	5,17 s (2)	7,35-7,45 m (5)	7,58 t (1)	-	
Z-Gly-Ala-OBt-Ester ^{a,b,c}	1,67 d (3)	3,94 d (2)	4,82 quin (1)	5,13 s (2)	7,30-7,45 m (5)	7,34 t (1)	8,96 d (1)	8,36 d (1); 8,02 d (1); 7,88 t (1); 7,67 t (1) ^d 8,05 d (1); 7,77 (1); 7,58 (1); 7,47 t (1) ^e
vermutlich der N-Acyl-OBt-Ester ^a	1,58 d (3)	3,90 d (2)	5,36 quin (1)	5,12 s (2)	7,30-7,45 m (5)	7,16 t (1)	8,62 d (1)	7,92; 7,69; 7,49; 7,38 ^f
Z-Gly-Ala-OAt-Ester ^{b,c}	1,74 d (3)	3,93 dd (2)	5,05 quin (1)	5,15 s (2)	7,30-7,47 m (5)		8,87 d (1)	7,55 dd; 7,7 dd; 8,47 d; 8,65 d; 8,8 d; 8,9 d ^g
Z-Gly-Ala-ONB-Ester ^b	1,50 d (3)	3,85 dd (2)	4,76 quin (1)	5,09 s (2)	7,30-7,45 m (5)	7,28 t (1)	8,58 d (1)	1,62 ^h ; 3,31-3,58 ⁱ ; 3,3 ^h ; 6,05 s 2CHolefin ^h ; 6,14 s 2CHolefin ⁱ ; 10,83 ^h
Z-Gly-Ala-F (CD ₂ Cl ₂) ^b	1,47 d (3)	3,89 d (2)	4,58 quin (1)	5,09 s (2)	7,23-7,4 m (5)		8,62 d (1)	

^a aus einem TOCSY ¹H-NMR-Experiment erhalten (siehe Kapitel 3.2.3., Abb. 18)

^b *in situ* gemessen, enthält geringfügige Reste von Ausgangspeptid

^c Verunreinigung von Oxazolon

^d Signale des O-Acyl-OBt-Esterteils

^e Signale von HOBt

^f vermutlich aromatische CH-Protonen des N-Acyl-OBt-Esters

^g Signale des OAt-Esters oder von freiem HOAt

^h Signale von freiem HONB

ⁱ Signale des ONB-Esterrestes

Tab. 18: ^{13}C -NMR chemische Verschiebungen in ppm der Z-Gly-Ala-Aktivspezies bei verschiedenen kinetischen Messungen, aufgenommen in $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{DMF-d}_7$

Verbindung	CH_3 (Ala)	CH_2 (Gly)	CH (Ala)	CH_2 (Z)	CHphenyl	Cq	CO	Andere
Z-Gly-Ala-OH (APT)	17,6	44,1	48,2	66,1	128,1; 128,1; 128,7	137,8	157,2; 169,5; 174,4	
Z-Gly-Ala-OH/DIEA	18,9	44,7	49,8	66,2	128,1; 128,2; 128,9	137,9	157,3; 168,8; 175,4	DIEA: 13,9 (CH_3), 18,8 2(CH_3) ₂ ; 40,8 (CH_2); 51,7 (2CH)
Z-Gly-Ala-Oxazolone (APT)	16,5	39,2	60,6	66,6	128,2; 128,3; 128,9	137,6	157,2; 160,1; 179,7	
Z-Gly-Ala-OBt-Ester	16,5	44,1	47,8	66,4	128,2; 128,3; 128,8	137,6	157,1; 170,3; 171,0	110,0; 119,5; 120,1; 124,8; 125,8; 143,7 ^a
Z-Gly-Ala-OAt-Ester	17,3	44,4	47,4	66,7	128,4; 129,0; 129,2	138,0	157,5; 170,1; 171,0	121,1; 122,2; 130,2; 151,5; 153,1 ^b
Z-Gly-Ala-ONB-Ester (APT)	17,5	44,2	46,5	66,4	128,2; 128,8	137,9	157,3; 170,0; 170,4	42,7 (2CH); 45,0 (2CH); 51,5 (CH_2); 135,2 (2CHolefin); 173,3 (2CO) ^c

^a Signale des OBt-Esterteils oder von freiem HOBt

^b Signale des OAt-Esterteils oder von freiem HOAt

^c Signale des ONB-Esters oder von freiem HONB

Tab. 19: ^1H -NMR und ^{13}C -NMR chemische Verschiebungen in ppm verschiedener Referenzverbindungen, die im Verlauf der Aktivierungsreaktionen verwendet wurden

TBTU: ^1H -NMR (DMF- d_7)	3,25 (s, 6, 2CH_3); 3,63 (s, 6, 2CH_3); 7,75 (t, 1, CH); 7,80 (d, 1, CH); 8,01 (t, 1, CH); 8,12 (d, 1, CH)
^{13}C -NMR (DMF- d_7)	41,7 (2CH_3); 42,1 (2CH_3); 115,0; 116,0; 127,6; 133,7 (4xCH); 133,5; 134,1; 151,4 (2xCq , C^+)
HAPyU: ^1H -NMR (DMF- d_7)	1,90-2,50 (m, 8, 4CH_2); 3,60-4,40 (m, 8, $4\text{CH}_2\text{N}$); 8,08 (dd, 1, CH); 8,55 (d, 1, CH); 8,90 (d, 1, CH)
^{13}C -NMR (DMF- d_7)	24,9+26,5 (4CH_2); 52,2+53,8 ($4\text{CH}_2\text{N}$); 124,6; 128,5; 150,0 (3xCH); 127,5; 143,4 (2xCq); 145,8 (C^+)
HOBt: ^1H -NMR (DMF- d_7)	7,45 (t, 1, CH); 7,55 (t, 1, CH); 7,78 (d, 1, CH); 8,00 (d, 1, CH)
^{13}C -NMR (DMF- d_7)	110,2 (CH); 119,8 (CH); 125,0 (CH); 127,9 (CH); 128,9; 143,9 (2xCq)
HONB: ^1H -NMR (DMF- d_7)	1,63; 3,33 (2m, 6, CH_2 , 4xCH); 6,08 (s, 2, 2CHolefin); 15 (s, 1, OH)
^{13}C -NMR (DMF- d_7)	42,8 (2CH); 44,6 (2CH); 51,3 (CH_2); 134,7 (2CHolefin); 173,2 (2CO)
Dicyclohexylharnstoff: TOCSY ^1H -NMR (CD $_2$ Cl $_2$ /DMF- d_7)	1,53; 1,64; 1,82 (m, 20, $2\text{x}5\text{CH}_2$); 3,48 (2, 2CH); 5,55 (d, 2, 2NH)
Tetramethylharnstoff:	
^1H -NMR (CDCl $_3$)	2,78 (s, 12, 4CH_3)
^{13}C -NMR (CDCl $_3$)	38,5 (4CH_3)
Bipiperidinoharnstoff	
^1H -NMR (CD $_2$ Cl $_2$)	1,40-1,62 (m, 12, 6CH_2); 3,11 (m, 8, $4\text{CH}_2\text{N}$)
^{13}C -NMR (CD $_2$ Cl $_2$)	25,2 (2CH_2); 26,2 (4CH_2); 48,2 ($4\text{CH}_2\text{N}$); 164,9 (CO)
Bipyrrolidinoharnstoff:	
^1H -NMR (CDCl $_3$)	1,79 (m, 8, 4CH_2); 3,34 (m, 8, $4\text{CH}_2\text{N}$)
^{13}C -NMR (CDCl $_3$)	25,5 (4CH_2); 47,9 ($4\text{CH}_2\text{N}$); 161,4 (CO)

Eidesstattliche Erklärung

Die Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1993 bis September 1996 am Institut für Biochemie der Humboldt-Universität zu Berlin und am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin angefertigt und von Herrn Dr. P. Henklein und Herrn Dr. M. Beyermann betreut.

Die Betreuung des Dissertationsvorhabens von seiten der Humboldt-Universität zu Berlin wurde von Herrn Prof. Dr. W. Abraham (Institut für Organische und Bioorganische Chemie) durchgeführt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Weder diese noch eine andere Arbeit wurde von mir an einer anderen Universität oder Hochschule zum Zwecke der Einleitung eines Promotionsverfahrens vorgelegt.

Berlin, im April 1998

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Abraham (Institut für Organische und Bioorganische Chemie) danke ich für die Betreuung des Dissertationsvorhabens von seiten der Humboldt-Universität zu Berlin.

Herrn Dr. P. Henklein (Institut für Biochemie, Humboldt-Universität zu Berlin) und Herrn Dr. M. Beyermann (Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) danke ich für die interessante Themenstellung und die jederzeit gewährte Unterstützung und hilfreichen Diskussionen im Verlauf der Arbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung des Forschungsvorhabens He 2131/1-1/2.

Herrn Prof. L. A. Carpino (Department of Chemistry, University of Massachusetts, Amherst, USA) gilt mein Dank für die Unterstützung bei den Untersuchungen zum Nachweis der O-Acyluroniumverbindung sowie für die hilfreichen Diskussionen.

Herrn H. Weißhoff (Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Chemie) danke ich für die Durchführung der ^{13}C -NMR-Tiefentemperaturmessungen im Rahmen der Untersuchungen zum Nachweis der O-Acyluroniumverbindung.

Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern des Forschungsinstituts für Molekulare Pharmakologie: Herrn Dr. R. Winter für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die ^1H - und ^{13}C -NMR-Techniken sowie für die Durchführung des TOCSY- ^1H -NMR-Experiments, Herrn Dr. H.-U. Heine für die Synthese des Chlorocarbonyloxybenzotriazols, Frau Dr. H. Haber für die Epimerisierungsuntersuchungen mit Hilfe der GC-MS-Technik und Herrn D. Runald und Herrn Kertscher für die Aufnahme der ES-MS-Spektren.

Außerdem danke ich Frau B. Brecht (Institut für Biochemie, Humboldt-Universität zu Berlin) für die Unterstützung bei der Synthese der C-terminalen Sequenz des ACP und Frau Glatte (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Humboldt-Universität zu Berlin) für die Hilfe bei der graphischen Präsentation der Ergebnisse.

Abschließend möchte ich allen weiteren Kollegen des Instituts für Biochemie, des Forschungsinstituts für Molekulare Pharmakologie und der Humboldt Universität zu Berlin danken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Lebenslauf

Christiane Hanay

geboren am:	13.09.1967 in Mühlhausen/Thüringen
Eltern:	Werner Hanay und Annemarie Hanay, geb. Pawel
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
1974-84	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Mühlhausen
1984-86	Abitur am Erich-Weinert-Gymnasium in Mühlhausen
Sept. 1986-Aug. 1987	Ausbildung zum Apothekenfacharbeiter am Pharmazeutischen Institut Mühlhausen/Erfurt
Sept. 1987-Juli 1992	Chemiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Diplompraktikum: Transmissions- und Rasterelektronen mikroskopie)
Okt. 1991-Juli 1992	Diplomarbeit am Institut für Glaschemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena zum Thema „Untersuchungen zur Kristallisation von Cordieritglas“
Aug. 1992-Juni 1993	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Ultrastruktur forschung der Universitätsklinik Jena zum Thema „Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Lipid-vermittelten Proteinanordnung in Liposomen-Modellmembranen und optoelektronischen Polymerschichten“
Juli 1993-Sept. 1996	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie der Humboldt-Universität zu Berlin, Abteilung Peptidchemie, Anfertigung der Dissertation zum Thema „Optimierung von Kupplungsverfahren für die Peptidsegmentkondensation“
seit Okt. 1996	Mitarbeiterin für Produktentwicklung bei der St. Etienne Cosmetic GmbH

Berlin, im April 1998